



Impact de la vitamine A du lait maternel sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né et la prévention des maladies allergiques

Mathilde Turfkruyer

► To cite this version:

Mathilde Turfkruyer. Impact de la vitamine A du lait maternel sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né et la prévention des maladies allergiques. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4103 . tel-01127336

HAL Id: tel-01127336

<https://theses.hal.science/tel-01127336>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Nice Sophia-Antipolis – UFR Sciences
Ecole doctorale Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée pour obtenir le grade de **DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**
Spécialité : Immunologie et microbiologie

Thèse présentée et soutenue par
Mathilde Turfkruyer

Impact de la vitamine A du lait maternel sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né et la prévention des maladies allergiques

Thèse dirigée par le Dr Valérie Verhasselt

EA 6302 Tolérance immunitaire

Hôpital de l'Archet 1

151 route St Antoine de Ginestière

06200 Nice

Thèse soutenue le **Jeudi 27 Novembre 2014** en présence des
membres du jury :

Pr Stéphane Schneider, président de jury

Dr Richard Lo-Man, rapporteur

Dr Véronique Flamand, rapporteur

Dr Karine Adel-Patient, examinateur

Dr Laurent Mascarell, examinateur

Dr Valérie Verhasselt, directrice de thèse

Je dédie cette thèse à tous les gens que j'aime et qui se reconnaîtront...

Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement de 3 années de travail qui m'ont fait grandir et ont changé ma vie. Malgré les quelques moments difficiles par lesquels je suis passée, je ne regrette rien de ces 3 années qui m'ont rendu plus forte et je suis très fière aujourd'hui du travail que j'ai effectué. Tout cela n'aurait pas été possible sans le soutien d'un certain nombre de personnes que je tiens particulièrement à remercier.

*Tout d'abord, je tiens à remercier le **Pr Stéphane Schneider** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également le **Dr Véronique Flamand** et le **Dr Richard Lo-Man** d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit de thèse ainsi que le **Dr Karine Adel-Patient** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Enfin, je remercie le **Dr Laurent Mascarell**, tout d'abord, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, mais également de m'avoir encadré au cours de ma 2^{ème} année de master. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je suis ravie d'avoir la chance de te garder dans mon entourage.*

*Je remercie du fond du cœur le **Dr Valérie Verhasselt** de m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans son équipe. Ces 3 années et plus à tes côtés m'ont énormément appris tant sur le plan professionnel que personnel. Ton enthousiasme, ta bonne humeur communicative et ta positive attitude sans limites ont été un vrai bonheur au quotidien. Tu m'as apporté le soutien dont j'avais besoin pour évoluer à mon rythme et c'est grâce à toi si je suis aujourd'hui la future chercheuse (ou enseignante chercheuse) que je suis devenue ;). Tes connaissances scientifiques (je ne sais toujours pas comment tu fais pour te rappeler le nom de l'auteur du papier que tu cherches dans tes tiroirs^^) et ton perfectionnisme à toute épreuve m'ont enseigné des qualités essentielles à la recherche. Ta patience et ton sens de l'écoute sont une denrée rare actuellement et je m'estime très chanceuse d'avoir pu partager tous ces moments avec toi. Tu as toujours été présente pour moi dans les moments heureux comme dans les moments difficiles que j'ai pu vivre et pour tout cela, tu auras toujours une place particulière dans mon cœur.*

*La deuxième personne sans qui rien de tout cela n'aurait été possible est bien sur ma très chère **Akila**. Tu m'as tellement appris au cours de toutes ces années que je ne sais pas par quoi commencer. Tu as été comme une grande sœur pour moi qui a su m'encadrer (avec beaucoup plus de patience qu'une vraie sœur je te l'accorde) et m'apprendre tout ce que je sais aujourd'hui. Je n'oublierai jamais les longues discussions qu'on a pu avoir, ton soutien dans les moments de crise, ta patience (quand tu m'encadrais mais aussi, et surtout, quand je râlais pour rien et stressais sans raison), ta gentillesse, ta disponibilité (même quand tu aurais dû me dire d'aller voir ailleurs si tu y étais^^) et nos crises de*

rires (parfois jaunes, parfois d'épuisement mais le plus souvent de joie). Tu as embelli mon quotidien et m'a permis de survivre à ces 3 années sans trop perdre la tête. Je te considère comme une amie, ne change rien.

Je tiens à remercier tous les membres actuels ou passés de l'EA6302, et plus particulièrement **Fred**, pour ton encadrement patient au FACS (même si je n'ai toujours pas compris pourquoi il ne veut marcher qu'avec toi^^), tes conseils, tes potins mondains au sommet et toutes nos discussions qui m'ont permis d'évacuer la pression du quotidien et de passer d'excellents moments au labo et **Méri** pour ta bonne humeur, ton soutien quotidien et ton aide au cours de la rédaction de THE article ;) . Je remercie également tous les stagiaires (**Angélique, Johan, Sarah, Laura** et tous les autres) qui ont apporté leur bonne humeur au labo et m'ont permis d'améliorer ma patience et ma pédagogie. Je remercie également **Samara** pour les discussions de ces derniers mois passés ensemble, **Francis** pour sa présence et son aide (souvent au dernier moment), et **Laurence** pour sa patience et son aide avec l'administration (qui m'a souvent fait m'arracher les cheveux).

Je remercie également nos anciens voisins de l'équipe des Wakkach, **Abdel, Claudine, Mathieu, Grazia, Agathe, Nourhène et Gaele** qui ont fait de mes 2 premières années de thèse un quotidien riche en bons moments, en partage et en discussions. Une spéciale dédicace à mon Tchoutchi d'amour (**Thomas** pour les moins intimes) qui est devenu bien malgré lui mon ami. Grâce à toi (et à une autre personne dont je parlerai plus loin...) ma 1^{ère} année de thèse a été la plus géniale des trois. Ton humour, ta présence et ton écoute m'ont été très précieux et je n'oublierai jamais nos délires à l'intérieur mais surtout à l'extérieur du labo ! Tu pourras faire ce que tu veux, on se retrouvera à la maison de retraite pour nous rappeler le bon vieux temps où on était jeunes et inconscients (maintenant en fait ;).

Je tiens également à remercier l'équipe de l'animalerie du C3M, **Yannick, Sandrine, Alexandre et Patrick** pour leur travail exceptionnel, et plus particulièrement **Véronique**, dont la patience à toute épreuve et les conseils m'ont permis de réaliser ma thèse dans d'excellentes conditions. Je remercie également le **Dr Francois Boutboul** et **Aurore** pour leur travail sur les dosages de vitamine A.

Tout ce travail de thèse n'aurait pas non plus été possible sans le soutien sans bornes de mes meilleurs amis. Tout d'abord, je tiens à remercier ma **Camillou** pour sa présence à mes côtés, son soutien dans ma vie professionnelle et personnelle, son épaule pour les soirs où ça n'allait pas, nos fous rires et nos délires pas toujours compréhensibles pour le commun des mortels, nos nuits blanches à refaire le monde et sa gentillesse à toute épreuve. Le moins que l'on puisse dire c'est que ces dernières années n'auront pas été faciles pour toi comme pour moi mais grâce à toi je m'en suis sortie et tu resteras pour toujours ma Brenda d'amour, ma BFF, ma Caméhaméha. Je serai toujours là pour toi quoi qu'il arrive par la suite. Je remercie également ma Goguette (ou **Emilie** mais c'est quand

même moins fun^^). Tu es arrivée dans mon bureau dans la même galère que moi et tu es devenue une de mes meilleures amies. Normal, tu es géniale ! Ta présence et ton soutien au quotidien m'ont permis de survivre à ces 3 années dans la joie et la bonne humeur (je remercie d'ailleurs Jean-Pierre qui se reconnaîtra^^). Encore un énorme merci pour ta patience dans mes séances de ralage intensif. Nos restos du midi, nos soirées, nos brunchs et nos virées shopping ont été une vraie parenthèse, une bouffée d'air, qui m'ont permis de tenir (même si mes jeans te remercient moins^^). Ton humour extraordinaire (et je dis pas ça parce que j'ai le même :p) et ta gentillesse font de toi une personne exceptionnelle que j'ai de la chance de connaître. Je vais tout faire pour te garder, de toute façon maintenant tu fais partie de la famille ;). Je remercie aussi ma **Flophie** ou Soso pour les intimes. Tu le sais, tu es comme ma sœur, et malgré les difficultés par lesquelles on est passées toi, comme moi, je trouve qu'on s'en est pas mal sorties ! La vie est encore longue mais tu sais que je serai toujours là pour toi. Il y a des choses qui ne changeront jamais et toi et moi ça en fait partie. Je remercie également mon **Deudeu**. Même si tu es parti loin de moi (halala quelle idée de faire une thèse^^), je sais que tu seras toujours là pour moi. Tu as une place particulière dans mon cœur. Tu m'as soutenue dans des moments très difficiles et tu m'as redonné le sourire à de nombreuses reprises. Tu as un cœur en or et tu mérites ce qu'il y a de mieux. Ne change rien. Je tiens également à remercier ma belle **Sarah**. Malgré la distance plus ou moins importante selon les moments, tu es et tu resteras une de mes meilleures amies. Je ne pourrais jamais me passer de nos discussions interminables et de nos fous rires mémorables. Tu es une personne exceptionnelle et je te souhaite encore plus de bonheur (parce que quand même un mari génial et un bébé magnifique, ça ne suffit pas !). Je remercie également **Lemichou** et **Lorraine**, pour leur présence et leur amitié qui m'est très précieuse. Je remercie aussi **Nico**, qui non seulement est la personne la plus importante dans la vie de deux des personnes que j'aime le plus, mais qui est également devenu un ami au cours du temps. Ton humour pas toujours compréhensible et ton soutien de thésard qui comprend m'ont été très précieux. De la même manière je remercie **Justine** pour les discussions de vieilles aigries qu'on a pu avoir mais surtout pour tous les bons moments d'amitié qu'on a pu partager.

Enfin, je tiens à adresser le plus grand de tous mes mercis à ma famille que j'aime plus que tout. Tout d'abord à ma **maman** d'amour sans qui je ne serai pas là. Ton amour sans failles, l'éducation que tu m'as donnée, ton soutien quotidien et ta patience à toute épreuve m'ont permis de devenir la femme que je suis aujourd'hui. Toutes les épreuves que tu as traversé m'ont montré qu'il ne faut jamais abandonné et m'ont rendu forte et courageuse. Tu peux en être fière. Mon plus grand bonheur serait de te ressembler ne serait-ce qu'un tout petit peu (même le petit caractère que tu m'as déjà généreusement transmis). Tu es mon modèle dans la vie et je t'aime plus que tout au monde. Ensuite je tiens à remercier mon **Denis** d'amour. Tu as été beaucoup plus qu'un père pour moi. Tu m'as apporté la stabilité et l'équilibre dont j'avais besoin. Tu es et tu resteras mon roc dans la vie. Ton soutien sans failles et tes conseils m'ont permis d'avancer et d'évoluer pour devenir quelqu'un de bien

*et d'équilibré. Tu as rendu ma vie meilleure. Et on sait tous les deux que si j'ai fait cette thèse c'est un peu grâce à toi. Je t'aime très fort et pour toujours. Je tiens également à remercier mon frère, **Stéphane**, que j'aime plus que tout. Même si nos années d'écart ne nous ont pas rendu les choses faciles, je sais que tu seras toujours là pour moi, quoi qu'il arrive. Tu es mon grand frère pour la vie et, malgré nos différences d'opinions, tu es quelqu'un de génial qui mérite tout ce qu'il y a de mieux. Je remercie également ma **Ninette** pour son soutien et sa gentillesse. Au bout de toutes ces années, je te considère comme ma sœur et je t'aime très fort. Je remercie également ma soeurette d'amour, **Mauve**, qui malgré la distance est toujours présente pour moi. Nos ressemblances comme nos différences font de notre relation, une relation indestructible que je suis heureuse d'avoir. Je t'aime. Je remercie également **Laurent** qui rend heureuse ma sœur. Tu ne peux pas imaginer comme je suis contente qu'elle t'ait trouvé. Voir ses yeux s'illuminer quand elle parle de toi suffit à me rendre heureuse. Vous ne seriez évidemment pas vous sans les quatre merveilles que vous avez créé, **Tom, Amélia, Lola et Eva**, qui ont illuminé ma vie au cours de ces dernières années. Je leur souhaite de grandir dans l'insouciance et le bonheur et d'avoir une vie la plus belle possible. Je remercie chaque jour le ciel (ou je ne sais qui est responsable de tout ça) d'avoir une famille aussi soudée, malgré les épreuves que la vie a mis sur notre chemin. Vous êtes mon équilibre et vous me rendez heureuse chaque jour.*

*Enfin, the last but not the least, le meilleur pour la fin diront certains, je tiens à remercier mon cœur d'amour, **Sébastien**. Tu es l'homme de ma vie, je t'ai enfin trouvé. Tu me rends heureuse et j'ai conscience que ces dernières années ça n'a pas été chose facile. Malgré les difficultés qu'on a pu traverser, quand je te regarde dans les yeux et que tu me souris, mon cœur s'emballe et j'oublie tout. Je t'aime tellement et pour tellement de raisons... Tu fais de ma vie un bonheur permanent et je nous souhaite de longues années d'amour, de rires et de partage. Ca y est, enfin, on y est, une page se tourne...*

Mathilde

PS : Pour ceux qui se posent la question, oui j'ai pleuré en écrivant ces pages mais c'était, cette fois, pour la bonne cause ;)

Résumé

Introduction : Les allergies sont aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Elles se déclarent dans la majorité des cas en début de vie et ont un impact considérable sur la vie quotidienne des enfants. La constante augmentation de la prévalence de ces maladies au cours des 30 dernières années ainsi que le manque de traitements curatifs font de la prévention une approche privilégiée. Afin d'établir une prévention optimale, il apparaît essentiel de mieux comprendre la mise en place des réponses immunitaires dès le plus jeune âge. La tolérance orale est un mécanisme de régulation fondamental au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin, qui permet d'induire une tolérance locale et systémique à l'encontre d'antigène administré oralement. Bien que ce mécanisme ait été bien étudié dans la prévention des maladies allergiques chez la souris adulte, très peu d'études se sont intéressées à la possibilité d'induire de la tolérance orale chez le nouveau-né. **Objectifs et méthodes :** Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'ontogénie de la tolérance orale en administrant au souriceau un allergène modèle, l'ovalbumine (OVA), au cours de la 1^{ère}, la 2^{ème} ou la 3^{ème} semaine par voie orale, via le lait maternel. Afin d'évaluer l'efficacité de la mise en place de la tolérance orale, j'ai étudié chez ces mêmes souris à l'âge adulte, les réponses allergiques à l'OVA au niveau respiratoire afin de déterminer si une tolérance systémique avait bien été établie. **Résultats : (1)** Lorsque le souriceau reçoit l'antigène par voie orale au cours de la 3^{ème} semaine, il est protégé à l'âge adulte contre le développement d'allergies. Contrairement à ce qui est décrit chez l'adulte, la tolérance orale induite au cours de la 3^{ème} semaine de vie n'est pas médiée par l'induction de lymphocytes T régulateurs Foxp3, Tr1 (sécrétant de l'IL-10) ou Th3 (sécrétant du TGF- β), mais par une déviation des réponses immunitaires vers une différenciation de type Th1, médiée par l'IFN- γ . **(2)** Lorsque le souriceau reçoit l'antigène au cours de la 1^{ère} semaine de vie, il n'y a pas de mise en place de tolérance orale. L'étude de la fonction et du phénotype des cellules dendritiques des ganglions mésentériques du souriceau m'a permis de mettre en évidence un défaut de présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4. Le défaut de présentation d'antigène est associé à un défaut de capture de l'antigène ainsi qu'à un déficit d'expression par les cellules dendritiques CD103+ de la Retinaldéhyde deshydrogénase (RALDH), enzyme responsable de la conversion de rétinol en acide rétinoïque, un cofacteur de différenciation des lymphocytes T au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin. J'ai ensuite observé que le déficit en cellules dendritiques CD103+ RALDH+ était associé à une déficience en rétinol sanguin chez le nouveau-né. **(3)** Afin de confirmer que cette déficience était bien à l'origine des défauts du système immunitaire observés en début de vie, j'ai administré un régime enrichi en vitamine A aux mères allaitantes. Ainsi, j'ai pu augmenter les taux de rétinol sanguins du nouveau-né et le pourcentage de cellules dendritiques CD103+ RALDH+. J'ai également rétabli une bonne capacité de capture de l'antigène chez ces cellules dendritiques, améliorant ainsi la capacité des cellules dendritiques néonatales à présenter l'antigène et à induire une différenciation Th1. Enfin, cet enrichissement de l'alimentation maternelle avec de la vitamine A a permis d'établir de la tolérance orale dès la 1^{ère} semaine via un mécanisme comparable à celui observé chez les souriceaux âgés de 3 semaines, à savoir une déviation vers une différenciation Th1. **Conclusion :** Ma thèse apporte des connaissances fondamentales sur les capacités immunitaires du nouveau-né et notamment sur la fonction de ses cellules dendritiques au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin. Le déficit en vitamine A du nouveau-né semble jouer un rôle central dans son incapacité à mettre en place de la tolérance orale et à se protéger contre le développement d'allergies. Ces observations suggèrent de nouvelles voies de prévention des maladies allergiques adaptées et spécifiques au début de vie, telles que la supplémentation en vitamine A.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	6
Liste des abbréviations	9
Avant-propos	11
Introduction.....	12
I) Les réponses immunitaires : adulte vs nouveau-né	13
1) Généralités sur le système immunitaire	13
2) Les réponses T CD4+ chez l'adulte	16
a) <i>Le premier acteur : la cellule dendritique</i>	16
b) <i>Les lymphocytes T CD4+ effecteurs</i>	18
c) <i>Les lymphocytes T CD4+ régulateurs</i>	20
3) Les réponses T CD4+ chez le nouveau-né	25
a) <i>Généralités sur les défenses immunitaires du nouveau-né</i>	25
b) <i>Le développement du système immunitaire</i>	27
c) <i>Historique des connaissances sur les réponses immunitaires du nouveau-né</i>	29
d) <i>Les spécificités immunitaires du nouveau-né</i>	31
e) <i>Le rôle de l'allaitement dans le développement des réponses immunitaires du nouveau-né</i> ...	37
II) La tolérance orale	44
1) La tolérance orale chez l'adulte	44
a) <i>Généralités</i>	44
b) <i>Mécanismes</i>	45
c) <i>Les différents modèles expérimentaux de tolérance orale</i>	56
d) <i>Rôle du microbiote intestinal</i>	59
2) La tolérance orale chez le nouveau-né.....	61
a) <i>Un défaut d'induction de tolérance orale</i>	61
b) <i>...compensé par l'allaitement maternel</i>	63
III) Maladies allergiques et tolérance orale	66
1) Mécanisme de l'allergie.....	66
2) Les maladies allergiques.....	68
a) <i>Les allergies alimentaires</i>	68
b) <i>Les allergies respiratoires</i>	69
c) <i>La dermatite atopique</i>	69
3) Les traitements.....	70

a) Les traitements symptomatiques	70
b) L'induction de tolérance : l'immunothérapie.....	70
4) La prévention des allergies par l'induction de tolérance orale	71
IV) La vitamine A	73
1) Généralités	73
2) Le métabolisme de la vitamine A	73
a) L'absorption intestinale et le transport	74
b) Le métabolisme hépatique des rétinoïdes	74
c) L'assimilation des rétinoïdes par les tissus extra-hépatiques.....	75
d) La génération d'acide rétinoïque.....	76
3) La vitamine A dans la physiologie.....	77
a) Le développement embryonnaire	78
b) La vision	79
c) Le tissu épithélial	79
d) La reproduction	80
4) La vitamine A dans l'immuno-régulation	80
Objectifs de la thèse	82
Résultats	84
I) Synthèse des résultats.....	85
II) Article	87
Discussion	130
I) Les taux de vitamine A chez le nouveau-né humain.....	131
II) La vitamine A dans la tolérance orale	133
1) Impact de la vitamine A sur les lymphocytes T régulateurs.....	133
2) La tolérance orale in vivo	134
III) La vitamine A dans la prévention des maladies allergiques.....	136
IV) Les spécificités des cellules dendritiques néonatales	138
V) La différenciation Th1 induite par l'administration orale d'un antigène en début de vie	140
1) L'IFN- γ dans la tolérance orale	140
2) L'IFN- γ dans l'allergie.....	141
3) L'IFN- γ en début de vie	141
Conclusions générales et perspectives.....	143
Références.....	145

Liste des abbréviations

ALDH : alcool déshydrogénase

APC : cellule présentatrice d'antigène

ARAT : acyl-coA rétinol acyltransférase

Cellule M : cellule microfold

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CRBP : cellular rétinol-binding protein

DC : cellule dendritique

DTH: hypersensibilité de type différé

EGF : epidermal growth factor

FAE: épithélium associé au follicule

Foxp3 : forkhead box p3

HSC : cellule souche hématopoïétique

HSC : cellule stellaire hépatique

IFN : interféron

Ig : Immunoglobuline

IGF : insulin growth factor

IL : interleukine

ILC : innate lymphoid cell

IPEX : dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, syndrome lié au chromosome X

iTreg : lymphocyte T régulateur induit

LDL : lipoprotéine de faible densité

LRAT : lécithine rétinol acyle transférase

MLN: ganglion mésentérique

NK : Natural Killer

nTreg: lymphocyte T régulateur naturel

OVA : ovalbumine

RALDH: rétinaldéhyde déshydrogénase

RBP : rétinol-binding protein

REH : rétinyl ester hydrolase

SED: dôme sub-épithélial

TCR : récepteur T

TGF : transforming growth factor

Th : T helper

TNF : tumor necrosis factor

Avant-propos

L'objectif de ma thèse est l'étude des mécanismes à l'origine du développement des réponses immunitaires du nouveau-né dans un contexte d'induction de tolérance orale via l'allaitement.

I) Afin d'introduire mes résultats, je vais dans une première partie présenter les réponses immunitaires de l'adulte puis les spécificités propres de celles du nouveau-né. Je commencerai par une brève présentation schématique des différents acteurs de l'immunité afin de me concentrer sur les réponses immunitaires impliquant les lymphocytes T CD4+ effecteurs puis régulateurs. Je mettrai ensuite en évidence les particularités des réponses T CD4+ du nouveau-né en insistant sur les défauts immunitaires observés en période néonatale et leurs possibles mécanismes. Je mettrai également l'accent sur l'impact majeur de l'allaitement sur les réponses immunitaires en tout début de vie.

II) J'introduirai ensuite la notion de tolérance orale comme acteur physiologique majeur d'homéostasie immunologique mais également comme outil d'induction de protection systémique contre les antigènes donnés par voie orale chez l'adulte. Je mettrai en avant le lieu et les étapes clés de l'induction de tolérance orale puis l'impact que peut avoir le microbiote intestinal sur son induction. Enfin, je mettrai en évidence le peu de connaissances établies sur ce mécanisme pourtant essentiel chez le nouveau-né et l'impact de l'allaitement sur ce processus.

III) Afin d'expliquer le rôle majeur de la prévention des allergies par l'induction de tolérance orale, j'introduirai les maladies allergiques en expliquant leur mécanisme, leurs différentes manifestations physiologiques et j'insisterai sur le manque de traitements curatifs afin de mettre l'accent sur l'importance d'une action précoce afin de prévenir le développement de ces maladies très handicapantes.

IV) Enfin, ma thèse ayant permis de mettre en évidence un déficit physiologique en vitamine A sérique chez le nouveau-né affectant l'induction de tolérance orale, j'introduirai la vitamine A dans un contexte général physiologique puis dans son impact reconnu sur les défenses immunitaires.

Je présenterai ensuite les objectifs de ma thèse puis les résultats obtenus afin d'y répondre. Les résultats seront présentés sous la forme d'une synthèse des résultats obtenus suivie de l'article correspondant (actuellement en révision pour Journal of allergy and clinical immunology, JACI-D-14-01037).

Enfin, au cours de la discussion, j'intégrerai les résultats obtenus au cours de ma thèse dans un contexte bibliographique.

Introduction

I) Les réponses immunitaires : adulte vs nouveau-né

1) Généralités sur le système immunitaire

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme. On appelle réponse immunitaire le déclenchement du système immunitaire face à un antigène. Il en existe deux types: l'innée et l'acquise (également appelée adaptative) (voir Figure 1).

➤ La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée ou non-spécifique agit en ne tenant pas compte de l'antigène qu'elle combat. Elle constitue la première ligne de défense face à une infection (après les barrières physiques telles que la peau ou les muqueuses). Les cellules de l'immunité innée réalisent pour la plupart la phagocytose : un système d'absorption et de dégradation de l'antigène non spécifique. Les cellules phagocytaires sont les granulocytes neutrophiles (les plus nombreux) et les monocytes, qui se transformeront par la suite en macrophages. Les macrophages ont également la capacité de participer à la réponse adaptative grâce à leur fonction de présentation de l'antigène.

Dans l'immunité innée on note également la présence de granulocytes éosinophiles, basophiles et de mastocytes. Le rôle essentiel des éosinophiles est de s'attaquer aux parasites de l'organisme, sans les phagocyter : ils se fixent dessus et déversent leurs granules contenant des enzymes destinées à les détruire. Les basophiles contiennent des vacuoles avec des substances toxiques à la fois pour l'antigène à détruire et pour l'organisme (histamine, héparine). Eosinophiles, basophiles et mastocytes jouent également un rôle dans l'allergie. Les IgE (immunoglobulines spécifiques de l'allergie) se fixent à la surface du mastocyte, puis en présence de l'allergène, induisent la dégranulation du mastocyte et la libération de médiateurs chimiques tels que la sérotonine, l'histamine ou l'héparine.

Les « innate lymphoid cells », ou ILC, sont une nouvelle population cellulaire émergeant comme d'importants effecteurs de l'immunité innée ayant un rôle central dans le remodelage tissulaire. Les prototypes de cette population sont les cellules NK (Natural Killer), découvertes en 1975, et les LTi (lymphoid-tissue inducer), découvertes en 1997. Les cellules NK ont pour cibles les cellules de l'organisme infectées par des virus et les cellules tumorales. Elles sont cytotoxiques et réalisent l'histolyse des cellules de manière non spécifique notamment grâce à la sécrétion de perforine et de granzyme. Les LTi sont essentiels à la formation des organes lymphoïdes au cours de l'embryogénèse. Plus récemment, des populations distinctes d'ILC (ILC1, 2, 3) ont été mises en évidence, provenant d'une origine développementale commune. Ces différentes ILC ont une expression de cytokines semblable aux différentes classes de lymphocytes T CD4+ helper. Elles sont essentielles pour les réponses immunitaires précoces à l'encontre des micro-organismes et contribuent à la réparation des tissus et au maintien de l'intégrité épithéliale aux niveaux des barrières de l'organisme. Elles peuvent également être impliquées dans des pathologies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, pour les ILC sécrétant de l'IL-17 ou de l'IFN- γ , ou dans certains modèles d'asthme allergique pour les ILC sécrétant des cytokines de type Th2 (Spits et al., 2013).

Enfin la dernière cellule qui permet de faire la jonction entre le système immunitaire inné et adaptatif est la cellule dendritique. Ses fonctions seront décrites en détail par la suite mais, pour résumer, la cellule dendritique est capable de phagocyter tous les antigènes de manière non spécifique, de les dégrader puis d'exprimer à sa surface des peptides antigéniques via un complexe d'immunohistocompatibilité de type I (CD8+) ou II (CD4+). Grâce à ce mécanisme et à l'expression d'autres molécules, la cellule dendritique va induire l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD8+ et CD4+ qui font partie de la réponse immunitaire adaptative.

➤ La réponse immunitaire acquise ou adaptative

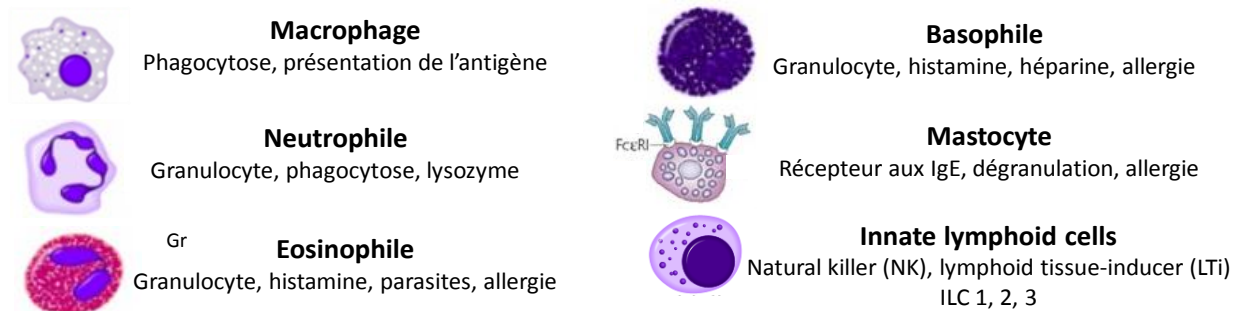
La réponse immunitaire acquise ou adaptative est spécifique de l'antigène et fait intervenir des cellules spécialisées appelées lymphocytes. Il en existe deux classes : les lymphocytes B et les lymphocytes T.

Les lymphocytes B sont responsables de la réponse humorale grâce à leur production d'anticorps ou immunoglobulines. Lorsqu'ils rencontrent un antigène, ils le capturent directement, s'activent, prolifèrent et génèrent des anticorps. Ils se différencient ensuite en plasmocytes, qui sécrètent les anticorps spécifiques de l'antigène. Ces anticorps sont alors capables de se fixer sur les protéines étrangères et d'induire leur dégradation.

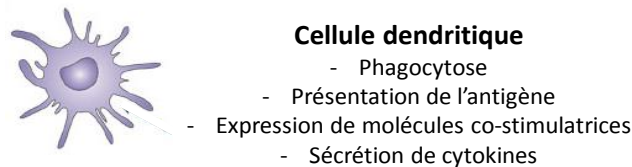
Les lymphocytes T sont responsables quant à eux de la réponse cellulaire. Ils sont de deux types CD4+ et CD8+. Les lymphocytes T CD8+ sont dits cytotoxiques puisqu'ils dégradent directement les cellules infectées exprimant à leur surface le peptide antigénique qui leur a été présenté via le CMH I. Les lymphocytes T CD4+ peuvent être de type effecteur ou régulateur selon leur fonction et leur sécrétion de cytokines. Ils sont activés grâce à la présentation de l'antigène par le CMH II des cellules dendritiques. Ils seront eux aussi décrits plus en détails par la suite mais pour résumer, les lymphocytes T CD4+ effecteurs sont dits auxiliaires ou helper et peuvent être Th1 ou Th17 quand ils jouent un rôle pro-inflammatoire ou de type Th2 quand ils jouent un rôle dans l'immunité contre les parasites ou l'allergie. Les lymphocytes T CD4+ sont dits auxiliaires puisque grâce à leur sécrétion de cytokines et à leur contact, ils permettent d'amplifier la réponse d'autres cellules immunitaires telles que les phagocytes ou les lymphocytes B. Les lymphocytes T régulateurs quant à eux inhibent les réponses des autres types de lymphocytes T afin d'empêcher des réponses immunitaires trop importantes, auto-immunes ou délétères pour l'organisme.

Figure 1 : Schéma du système immunitaire

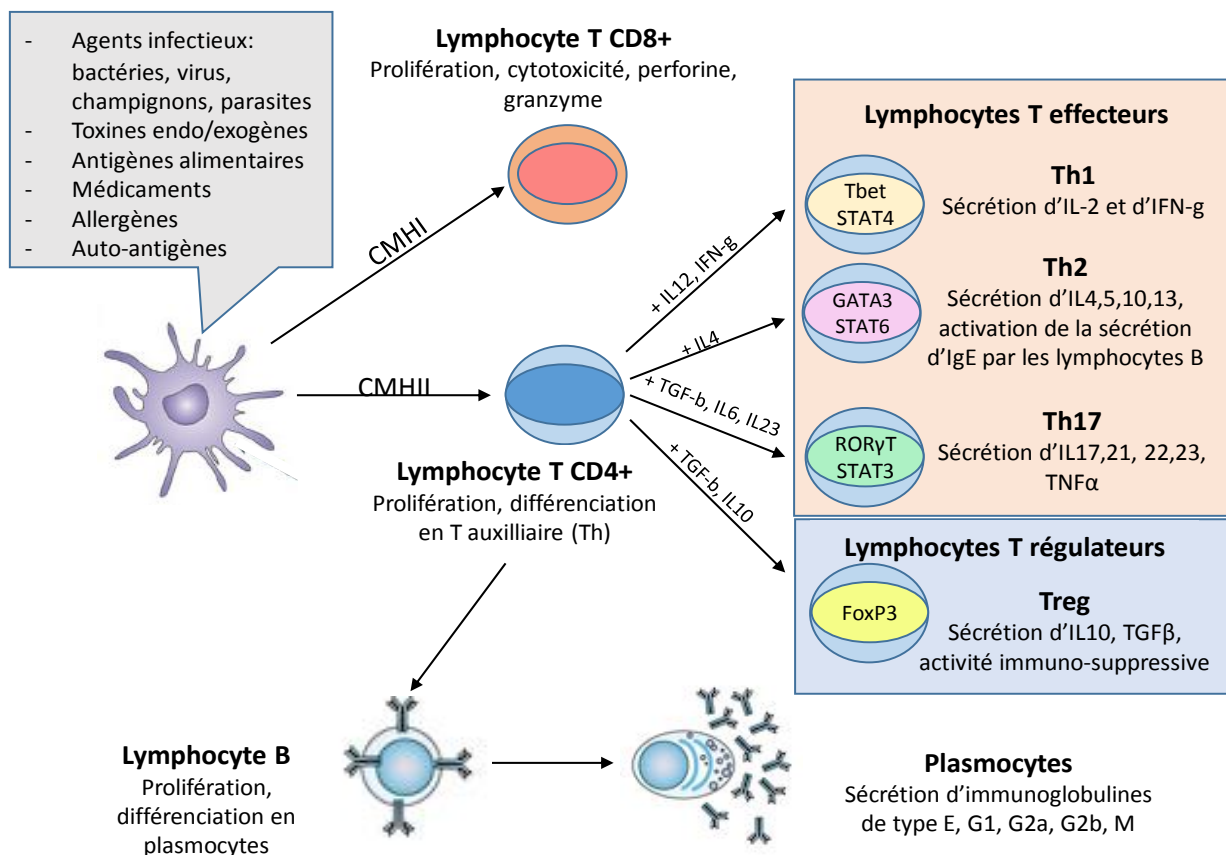
Système immunitaire inné



Interface inné/adaptatif



Système immunitaire adaptatif



2) Les réponses T CD4+ chez l'adulte

a) Le premier acteur : la cellule dendritique

Parmi les cellules présentatrices d'antigène (APC) professionnelles, on retrouve les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques qui ont été mises en évidence comme le premier acteur indispensable de l'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs. Contrairement aux lymphocytes B qui sont directement capables de reconnaître l'antigène via leur récepteur B, les lymphocytes T nécessitent que l'antigène soit dégradé et qu'un peptide antigénique particulier leur soit présenté par des cellules présentatrices d'antigène (APC). Le récepteur T (TCR) reconnaît des fragments antigéniques liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des APC. Ces CMH peuvent être de deux types, le CMH I va stimuler la différenciation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques alors que le CMH II va stimuler la différenciation des T CD4+ auxiliaires (Th). Les antigènes intracellulaires sont dégradés en peptides dans le cytosol des APC, liés au CMH I et reconnus par les CD8+ cytotoxiques capables de directement détruire la cellule cible. Les antigènes extracellulaires entrent dans la voie de l'endocytose de l'APC et sont généralement présentés via le CMH II aux lymphocytes T CD4+. Les antigènes exogènes peuvent également être présentés via le CMH I aux lymphocytes T CD8+ grâce à un processus de présentation croisée (den Haan and Bevan, 2001).

Parmi les APC, les cellules dendritiques sont les plus efficaces (Banchereau and Steinman, 1998).

- Les cellules dendritiques (DC) doivent leur nom à leur forme particulière étoilée, due à des prolongements cytoplasmiques dits dendrites capables de s'allonger ou de se rétracter en fonction des besoins
- Elles sont localisées dans tous les tissus lymphoïdes et la grande majorité des tissus non lymphoïdes.
- Elles sont capables de capturer et de dégrader l'antigène et disposent d'un grand nombre de complexes CMH-peptide à leur surface : de 10 à 100 fois plus que les autres APC (Inaba et al., 1997).
- Elles peuvent migrer jusqu'aux organes lymphoïdes où elles vont activer les lymphocytes T spécifiques de l'antigène via l'interaction du CMH des cellules dendritiques avec le récepteur T (TCR) des lymphocytes T (voir Figure 2). In vitro, une seule cellule dendritique est capable d'activer entre 100 et 3000 lymphocytes T.
- Les cellules dendritiques expriment également à leur surface des molécules de co-stimulation essentielles à l'activation des lymphocytes T (Medzhitov and Janeway, 1997). Ces molécules sont capables d'interagir directement avec les lymphocytes T afin d'augmenter l'adhésion et l'activation des différentes voies de signalisation. On distingue d'une part le CD40 qui interagit avec le CD40L des lymphocytes T et d'autre part le CD86 et le CD80 qui interagissent avec le CD28 des lymphocytes T. La liaison du CD40 ligand au CD40 va agir de manière essentielle sur la phase effectrice de la réponse en agissant à la fois sur la réponse humorale et la réponse cellulaire. L'engagement du CD40 des DC par le CD40L exprimé à la surface des T activés va entraîner la maturation des DC et leur production d'IL-12 avec, comme conséquence, une augmentation de l'activation des lymphocytes T et leur polarisation vers un phénotype Th1 (Laman et al., 1996). L'activation du CD28, quant à elle, va permettre d'induire des réponses T

à très faible niveau de stimulation antigénique et d'induire des facteurs anti-apoptotiques permettant ainsi le maintien de la réponse (Lenschow et al., 1996).

- Enfin, les cellules dendritiques sont également l'acteur essentiel de la polarisation des lymphocytes T CD4+. En effet, les DC matures sont capables de synthétiser diverses cytokines en fonction des conditions. Ainsi, elles vont pouvoir sécréter de hauts niveaux d'IL-12 augmentant par ce biais la prolifération des lymphocytes T et plus particulièrement induisant la génération de lymphocytes Th1 (Hsieh et al., 1993; Macatonia et al., 1995). Cette sécrétion d'IL-12 est fortement stimulée par la présence d'agents microbiens, d'IFN- γ ou encore la neutralisation de l'IL-4. Inversement, les cellules dendritiques peuvent également induire la génération de lymphocytes Th2 au détriment des lymphocytes Th1 en présence d'IL-4 (Seder et al., 1992), en absence de stimuli forts, ou encore lorsque la capacité de production d'IL-12 par les cellules dendritiques est faible. Les cellules dendritiques peuvent également sécréter de l'IL-6 ou de l'IL-23 à l'origine de la différenciation des lymphocytes Th17 ou du TGF- β ou de l'IL-10 qui induit des lymphocytes T régulateurs (voir description plus bas).

Pour toutes ces raisons, les cellules dendritiques ont un rôle central dans l'activation des lymphocytes T naïfs afin d'initier des réponses immunitaires efficaces via l'induction de réponses T CD4+ effectrices mais sont également des acteurs majeurs du maintien de la tolérance immunitaire grâce à leur induction de réponses T CD4+ régulatrices.

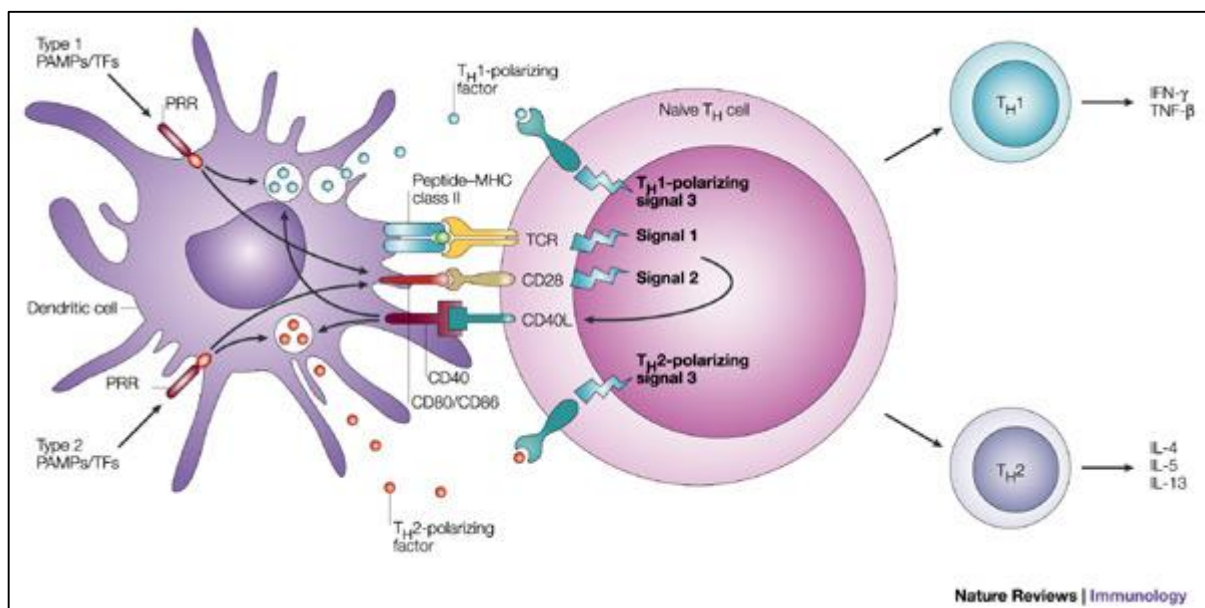


Figure 2: Mécanismes d'activation du lymphocyte T CD4+ par la cellule dendritique

D'après "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization de Martien L. Kapsenberg Nature Reviews Immunology 3 (December 2003)

Le signal 1 est le signal spécifique de l'antigène médié par l'interaction entre le CMH II portant le peptide et le TCR. Le signal 2 est le signal de costimulation principalement médié par la liaison du CD80 et CD86 des cellules dendritiques au CD28 du lymphocyte T. Enfin le signal 3 est le signal de polarisation qui est médié par différents facteurs solubles ou membranaires tels que l'IL-12 ou le CCL2 qui induisent une différenciation Th1 ou Th2, respectivement. Un autre signal médié par l'association du CD40 ligand à son récepteur permet d'amplifier la réponse.

b) Les lymphocytes T CD4+ effecteurs

Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle majeur dans les réponses immunitaires d'une part en ayant des fonctions effectrices directes et d'autre part en apportant de l'aide aux autres types cellulaires notamment grâce à leur sécrétion de cytokines. Lors d'une exposition à un antigène, les lymphocytes T s'activent, se multiplient et se différencient en lymphocytes T effecteurs de types Th1, Th2 ou Th17 se distinguant par leur fonction et leur sécrétion de cytokines (voir Figure 3).

➤ **Les lymphocytes Th1 et Th2**

Les lymphocytes Th1 et Th2 sont les deux types majoritaires de lymphocytes T effecteurs. Leur profil de sécrétion cytokinique et leur fonction sont aujourd'hui bien connus (Mosmann and Coffman, 1989).

- Les lymphocytes T de type Th1 produisent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et de la lymphotoxine (TNF- β). Ils sont impliqués dans les réponses pro-inflammatoires de type cellulaires. Les cytokines Th1 activent la cytotoxicité et les fonctions inflammatoires via notamment l'activation des macrophages. Ils jouent un rôle majeur dans les réponses aux pathogènes intracellulaires. Les lymphocytes Th1 sont également responsables de l'induction d'hypersensibilité de type différée (DTH) dans laquelle l'IFN- γ est exprimé au niveau des sites de réaction DTH (Tsicopoulos et al., 1992; Yamamura et al., 1991). Ils ont un rôle limité sur l'activation des lymphocytes B mais permettent cependant la génération d'immunoglobulines de type IgG2a (Del Prete et al., 1991). Ils ont un rôle bénéfique notamment dans les infections par des bactéries intracellulaires telles que les mycobactéries, certaines infections virales et les réactions allergiques. Ils ont au contraire été démontré comme délétères dans les infections aux helminthes et l'auto-immunité (Mosmann and Sad, 1996). Enfin, leur différenciation dépend de l'expression du facteur de transcription T-bet (Szabo et al., 2000).
- Les lymphocytes T de type Th2 sécrètent quant à eux de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et sont essentiels pour la génération des IgE par les lymphocytes B et pour l'élimination des pathogènes extracellulaires (Mosmann and Coffman, 1989). Ils augmentent la prolifération et améliorent la fonction des éosinophiles. Ils sont également impliqués dans les réponses médiées par les IgE comme les allergies. Ils ont un rôle favorable dans les réponses aux helminthes et dans certaines maladies auto-immunes mais ont un rôle très préjudiciable au niveau des allergies (Mosmann and Sad, 1996). De même que pour les lymphocytes Th1, la caractérisation des lymphocytes Th2 a permis de mettre en évidence le facteur de transcription GATA 3 comme nécessaire et suffisant à l'induction de ce type de lymphocytes T CD4+ (Zheng and Flavell, 1997).

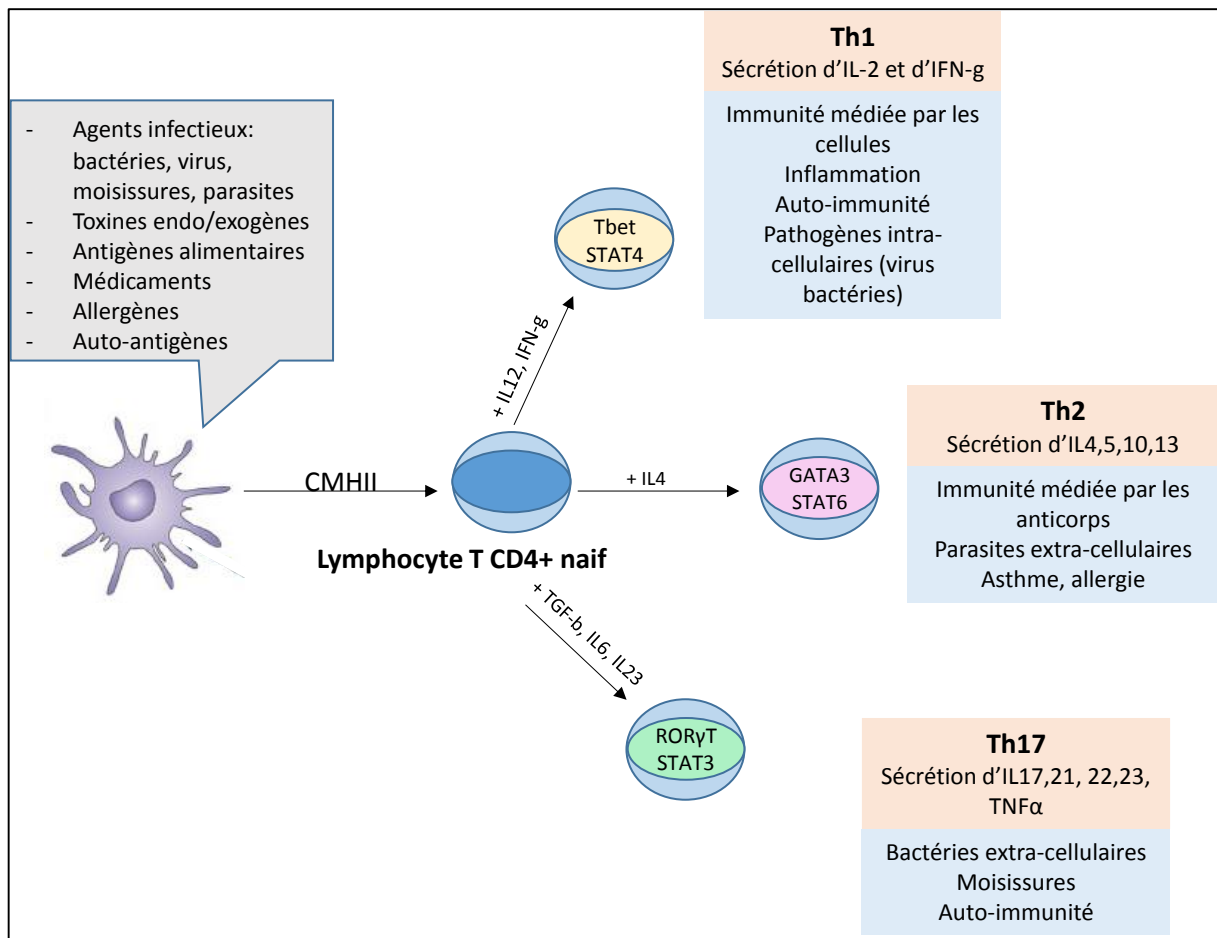
Les cytokines caractéristiques des lymphocytes Th1 sont capables d'inhiber la différenciation et la fonction des lymphocytes Th2 et inversement. Ainsi, l'IFN- γ inhibe la prolifération des lymphocytes Th2 et l'IL-10 inhibe la synthèse de cytokines par les lymphocytes Th1 (Fiorentino et al., 1989). Cette régulation croisée explique le fort biais des réponses immunitaires vers des réponses Th1 ou Th2 dans la plupart des affections. Dans certains cas, l'utilisation d'une cytokine pour altérer cet équilibre va permettre d'inverser la résistance ou la susceptibilité de l'hôte à l'infection ou à la maladie.

➤ Les lymphocytes Th17

Après la découverte et la caractérisation des deux voies principales de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ Th1 et Th2, l'identification d'une nouvelle cytokine impliquée dans l'encéphalomyélite auto-immune, l'IL-23 a remis en question la dichotomie des réponses immunitaires. La cytokine IL-23 est une molécule hétéro-dimérique, partageant une sous-unité (p40) avec l'IL-12, cytokine pro-Th1, mais différant de celle-ci par son expression de la sous-unité p19. L'IL-23, contrairement à l'IL-12 n'induit pas la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes Th1 qui sécrètent de l'IFN- γ mais induit la différenciation d'un autre type de lymphocytes T auxiliaires sécrétant de l'IL-17, de l'IL-6 et du TNF (Langrish et al., 2005). Le transfert adoptif de ces lymphocytes T sécréteurs d'IL-17 (Th17) permet d'induire l'encéphalomyélite auto-immune alors que le transfert des lymphocytes Th1, même s'ils sont capables eux aussi de passer la barrière cérébrale, ne permet pas d'induire cette maladie auto-immune. Ainsi, les souris déficientes pour le gène p19 (gène responsable de la synthèse d'IL-23) sont résistantes à l'induction de différents types d'auto-immunité dont l'encéphalomyélite auto-immune ou la maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) (Murphy et al., 2003). Au contraire, les souris traitées avec de l'anti-IL-17 ne sont pas totalement guéries mais développent des symptômes beaucoup moins sévères et les souris traitées avec de l'anti-IL-23 sont totalement protégées contre le développement d'encéphalite auto-immune expérimentale. Les lymphocytes Th17 jouent donc un rôle important dans la génération de l'auto-immunité. Leur rôle physiologique est d'apporter une immunité anti-microbienne au niveau des barrières épithéliales et mucosales. Ils produisent également des cytokines (comme l'IL-22) qui stimulent la sécrétion de produits antimicrobiens par les cellules épithéliales afin de défendre l'organisme contre certains types de bactéries (Staphylocoques par exemple). Un déficit en lymphocytes Th17 augmente donc la susceptibilité de l'individu aux infections opportunistes. Enfin, cette nouvelle classe de lymphocytes Th17 a été démontrée comme dépendante de l'expression du facteur de transcription particulier ROR γ t (Ivanov et al., 2006).

De manière comparable aux voies Th1 et Th2, il existe des interactions entre les voies Th1 et Th17. En effet, l'encéphalomyélite auto-immune induite par l'IL-23 et l'IL-17 est encore plus délétère en cas d'administration d'anti-IFN- γ démontrant ainsi une activité anti-inflammatoire de l'IFN- γ sur les dommages tissulaires induits par l'IL-17 et allant ainsi à l'encontre du classique état pro-inflammatoire déterminé pour les lymphocytes Th1 (Duong et al., 1994). De même, le rôle du TGF- β associé à l'IL-6 démontré dans l'induction des Th17 implique un lien entre Th17 et Treg via le TGF- β (expliqué ci-dessous). Ainsi, en présence d'IL-6, le TGF- β va induire des Th17 au détriment du tissu alors qu'en absence d'IL-6, le TGF- β va au contraire induire des lymphocytes T régulateurs protecteurs pour ce même tissu (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006).

Figure 3: Les différentes voies de différenciation des lymphocytes T CD4+ effecteurs



c) Les lymphocytes T CD4+ régulateurs

Les lymphocytes T CD4+ peuvent donc se différencier en T effecteurs, générant des réponses immunitaires inflammatoires mais également en T régulateurs générant dans ce cas des réponses immunosuppressives. Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont classés en deux catégories en fonction de leur origine : les Treg naturels (nTreg) induits dans le thymus et les Treg induits (iTreg) en périphérie lors d'une rencontre avec un antigène. Ces deux types de lymphocytes T régulateurs partagent de nombreuses caractéristiques communes et sont à la base de la tolérance périphérique qui vient compléter la tolérance centrale mise en place dans le thymus suite à la sélection des lymphocytes non réactifs au soi (voir Figure 4).

➤ Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg)

C'est dans les années 70 que le concept de cellules suppressives actives apparaît pour la première fois. (Gershon et al., 1972). Dans cette étude, les lymphocytes T du thymus sont capables d'interférer avec les réponses des autres thymocytes par contact et indépendamment des lymphocytes B ou des anticorps. Dans les années 90, de nombreux modèles animaux ont mis en évidence qu'une simple

manipulation du thymus induisait des maladies auto-immunes dans des animaux normaux (répertoriés dans (Sakaguchi, 2000)). Une thymectomie néonatale peut induire des dommages auto-immuns sur de nombreux organes comme la thyroïde ou l'estomac et la présence d'auto-anticorps spécifiques des tissus au niveau de la circulation. De même, une thymectomie chez un rat adulte va produire des atteintes auto-immunes, remédiables par une injection de thymocytes CD4⁺ CD8⁻ (Fowell and Mason, 1993). Ces résultats indiquent la présence possible de lymphocytes T réactifs envers le soi malgré la sélection négative ayant lieu dans le thymus mais également la présence au niveau du thymus d'un deuxième type de lymphocytes T capables de réguler l'auto-immunité en inhibant les premiers. Par la suite, l'étude de marqueurs spécifiques de ces lymphocytes T suppresseurs a permis de mettre en évidence le CD45RB (Powrie et al., 1994a; Powrie et al., 1994b) puis le CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) (Sakaguchi et al., 1995). Dans ce dernier cas, le transfert de cellules T déplétées des cellules CD25⁺ dans une souris athymique induit des dommages auto-immuns alors que le transfert d'une petite proportion de cellules CD4⁺ CD25⁺ permet de protéger la souris contre le développement d'une maladie auto-immune. De manière intéressante, la déplétion des Treg naturels conduit non seulement à une auto-immunité mais également à des réponses immunitaires non contrôlées contre des antigènes du non-soi comme par exemple des maladies inflammatoires du tube digestif induites par les bactéries commensales (Singh et al., 2001). Pour résumer, le système immunitaire normal via le thymus génère des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ capables d'inhiber des réponses immunitaires indésirables contre les antigènes du soi ou du non soi et qui persistent en périphérie.

Le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) a ensuite été identifié comme capable de contrôler le développement et la fonction des lymphocytes T régulateurs. L'identification de ce gène muté dans les individus atteints d'IPEX (dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, syndrome lié au chromosome X) et dans le modèle murin similaire scurfy a permis de mettre en évidence un lien entre la mutation de Foxp3 et l'expansion et l'activation incontrôlées des lymphocytes T CD4⁺ responsables des différents symptômes auto-immuns observés dans les deux cas (Brunkow et al., 2001; Wildin et al., 2001). La démonstration du rôle direct de Foxp3 sur la transcription des lymphocytes T régulateurs va permettre de compléter leur caractérisation phénotypique (Hori et al., 2003). Les lymphocytes T en périphérie CD4⁺CD25⁺ ainsi que les thymocytes CD25⁺CD4⁺CD8⁻ expriment le facteur de transcription Foxp3 alors que les autres lymphocytes T/thymocytes ne l'expriment pas. La transduction rétrovirale de Foxp3 dans des lymphocytes T CD25⁻CD4⁺ permet leur conversion en lymphocytes T régulateurs CD25⁺CD4⁺ capables de contrôler la prolifération d'autres lymphocytes T in vitro et d'inhiber le développement de maladies auto-immunes ou de maladies inflammatoires in vivo (Hori et al., 2003). Un haut niveau d'expression de Foxp3 est suffisant pour conférer à des lymphocytes T une activité suppressive comparable à celle des lymphocytes T régulateurs. Au contraire, une suppression génétique de Foxp3 dans les lymphocytes T va induire une auto-immunité massive. Foxp3 contrôle le développement des lymphocytes T régulateurs mais également leur fonction. En effet, Foxp3 contrôle directement ou indirectement plus de 700 gènes cibles auxquels il se lie directement pour environ 10% de ces gènes. (Marson et al., 2007; Zheng et al., 2007b). Parmi ces gènes, un grand nombre sont des modulateurs clés de l'activation et de la fonction des lymphocytes T. Les gènes auxquels se lie Foxp3 regroupent notamment des gènes responsables de la transduction du signal, de facteurs de transcription de cytokines, de molécules de surface, d'enzymes pour le métabolisme cellulaire ou encore de micro ARN (Sakaguchi et al., 2008). Ces analyses génomiques démontrent la capacité de Foxp3 à avoir un rôle tant activateur que répresseur

et un rôle essentiel dans la conversion des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes T régulateurs. Pour ces raisons, Foxp3 est encore actuellement le marqueur le plus fiable des nTreg.

Les mécanismes d'action des lymphocytes Treg Foxp3+ ont depuis bien été étudiés (pour les naturels comme pour les induits décrits par la suite) notamment in vitro. Leur action peut généralement se diviser en deux mécanismes. Le premier est la suppression directe des réponses effectrices des lymphocytes T via la sécrétion de cytokines suppressives (TGF- β , IL-10), l'inhibition de l'expression de l'IL-2 dans les lymphocytes T effecteurs ou la privation du milieu en IL-2 grâce à leur expression du CD25, induisant l'apoptose des lymphocytes T effecteurs. Les Treg peuvent également induire la cytolyse directe des lymphocytes T effecteurs par cytotoxicité via le granzyme B ou encore exprimer des molécules de surface comme la Galectin-1 induisant l'arrêt du cycle cellulaire des lymphocytes T effecteurs. Le deuxième mécanisme vise les cellules présentatrices d'antigène: les Treg peuvent exprimer le CTLA4, induisant une inhibition de l'expression des molécules co-stimulatrices, le LAG 3, bloquant la maturation des cellules présentant le CMH II, le CD39 comme mécanisme anti-inflammatoire ou encore le Nrp1 qui augmente le temps d'interaction entre les Treg et les cellules présentatrices d'antigène afin de les empêcher d'aller au contact des lymphocytes T effecteurs (répertoriées dans (Shevach, 2009). Encore aujourd'hui, les mécanismes de suppression des lymphocytes Treg in vivo ne sont pas clairement démontrés. Ils peuvent agir à des niveaux très différents et des mécanismes distincts voire même contradictoires peuvent prédominer en fonction des modèles expérimentaux comme par exemple, l'implication de l'IL-10 ou encore de l'IL-2.

➤ Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg)

En périphérie, les lymphocytes T naïfs peuvent aussi acquérir les fonctions de régulation propres aux lymphocytes T régulateurs. Par exemple, la stimulation antigénique in vitro de lymphocytes T naïfs en présence de TGF- β leur permet d'acquérir le marqueur Foxp3 et d'inhiber la prolifération de lymphocytes T effecteurs spécifiques de l'antigène. Ces cellules sont également capables de limiter l'expansion de lymphocytes T CD4+ in vivo. (Chen et al., 2003; Fantini et al., 2004). L'induction de Foxp3 sur les lymphocytes T régulateurs par le TGF- β est médiée par le recrutement des facteurs de transcription Smad3 et NFAT au niveau de la région activatrice du gène Foxp3 (Tone et al., 2008). In vivo, l'administration continue par voie sous-cutanée d'un peptide antigénique induit la génération de lymphocytes T régulateurs CD25+ Foxp3+ capables d'empêcher l'expansion de lymphocytes T effecteurs lors de l'administration ultérieure de l'antigène entier (Apostolou and von Boehmer, 2004). Enfin, la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques de l'antigène semble nécessiter une faible dose d'antigène, du TGF- β et une absence de costimulation (Kretschmer et al., 2005). Toutes ces études démontrent le rôle majeur du TGF- β dans l'induction de lymphocytes iTreg Foxp3+ (Li and Flavell, 2008). Cependant il semble que le TGF- β ne soit pas la seule cytokine inductrice de lymphocytes T régulateurs. En effet, la présence ubiquitaire du TGF- β dans de nombreux tissus, sécrété par différents types cellulaires et de manière plus ou moins importante selon le statut inflammatoire du tissu ne peut expliquer le nombre relativement constant de lymphocytes T régulateurs induits au cours de la vie (Rubtsov et al., 2010; Shevach, 2006). Il serait ainsi plus juste d'avancer le rôle essentiel du milieu dans lequel l'induction des lymphocytes T régulateurs a lieu. Ainsi, il semble évident que l'identification de cofacteurs amplifiant ou inhibant notamment le rôle du TGF- β et jouant un rôle majeur dans l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs est nécessaire. Par exemple la présence d'IL-6 associé au TGF- β va résulter en l'induction de réponses pro-inflammatoires de type Th17 en périphérie plutôt qu'en réponses régulatrices (Bettelli et al., 2006). L'IL-2 semble au contraire jouer un

rôle non négligeable à la fois dans la différenciation et le maintien des lymphocytes T régulateurs en périphérie mais aussi dans leur fonction (de la Rosa et al., 2004). L'IL-2 a également été mis en évidence comme un cofacteur essentiel du TGF- β pour l'induction de Foxp3 dans les lymphocytes T régulateurs en périphérie (Davidson et al., 2007; Zheng et al., 2007a). L'IL-2 active le facteur de transcription STAT5 qui se fixe alors sur le promoteur Foxp3 et active sa transcription (Burchill et al., 2007). Enfin, l'acide rétinoïque semble aussi être un cofacteur du TGF- β au cours de la différenciation en Treg Foxp3+ au niveau du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (discuté ci-dessous).

L'IL-10 permet également la génération de lymphocytes T régulateurs n'exprimant pas le Foxp3 mais ayant un rôle non négligeable dans la régulation des réponses effectrices. Ces lymphocytes T régulateurs dits Tr1 agissent comme suppresseurs de la réponse effectrice via la sécrétion d'IL-10 et sont indépendants des lymphocytes T régulateurs Foxp3+ (Vieira et al., 2004). Le rôle de l'IL-10 comme cytokine inductrice de lymphocytes T régulateurs a été mise en évidence dans les années 90. Des lymphocytes T différenciés en présence d'IL-10 acquièrent des capacités suppressives et inhibent le développement de maladies pro-inflammatoires comme la colite (Groux et al., 1997). Alors que les souris déficientes en IL-10 développent spontanément une maladie inflammatoire de l'intestin suite à une activation anormale et non contrôlée de lymphocytes T effecteurs (Kuhn et al., 1993), l'administration d'IL-10 peut au contraire restaurer la tolérance au microbiote intestinal chez des souris ayant développé une maladie inflammatoire de l'intestin (Steidler et al., 2000). Enfin, l'administration de cellules CD4+CD25+ différenciées en présence d'IL-10 permet de rétablir des réponses régulatrices dans une souris déficiente en IL-10 (Joetham et al., 2007). L'IL-10 semble donc être également une cytokine importante à la fois à l'induction et à la fonction d'une autre sous-population de lymphocytes T régulateurs induits. Toutefois il semble, là encore, exister un lien non négligeable entre le TGF- β et l'induction de lymphocytes T régulateurs Tr1. En effet, une étude indiquant l'impact de la sécrétion de TGF β sur la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes Tr1 met en évidence les échanges probables ayant lieu entre ces deux sous-types cellulaires (Kitani et al., 2003).

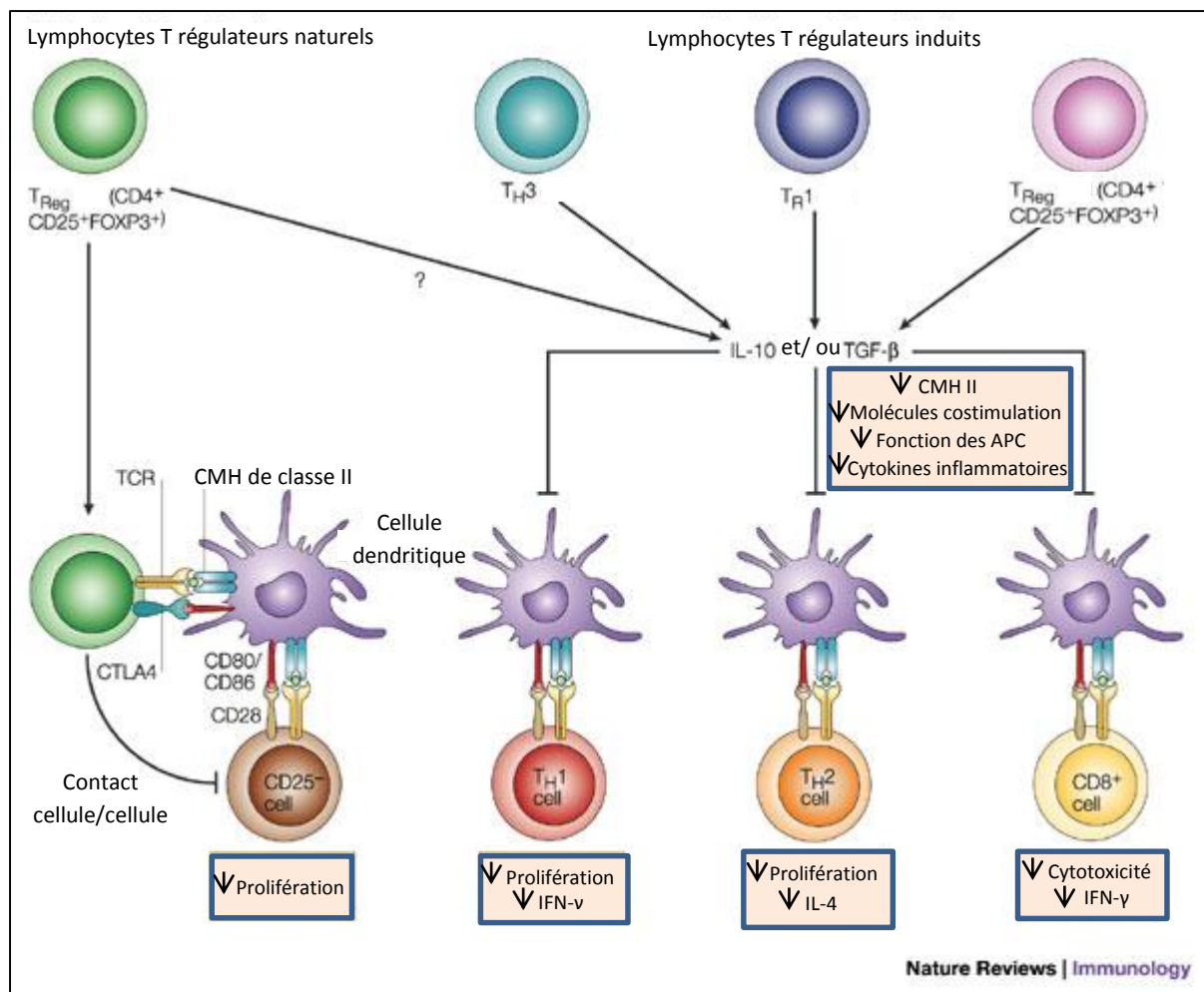


Figure 4 : Les différents lymphocytes T régulateurs

D'après "Regulatory T cells: friends or foes in immunity to infection?" de Kingston H. G. Mills, Nature Reviews Immunology (November 2004)

Les lymphocytes T régulateurs naturels CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻. Les mécanismes de cette inhibition sont multifactoriels et incluent notamment des inhibitions de contact. Les lymphocytes T régulateurs expriment le CTLA4 qui interagit avec le CD80 et le CD86 présents à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APC), telles que les cellules dendritiques pour délivrer un signal négatif à l'activation des lymphocytes T. Il semblerait également que le TGF-β et l'IL-10 jouent un rôle dans l'inhibition médiée par les lymphocytes T régulateurs naturels. Les lymphocytes T régulateurs induits incluent les Tr1 qui sécrètent de l'IL-10, les Th3 qui sécrètent du TGF-beta, et les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺ qui partagent les mêmes caractéristiques phénotypiques que les lymphocytes T régulateurs naturels. Les cytokines immunosuppressives sécrétées par les lymphocytes T régulateurs inhibent la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs Th1, Th2 et Th17, ainsi que l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺, de manière directe ou grâce à leur influence sur la maturation et l'activation des cellules dendritiques.

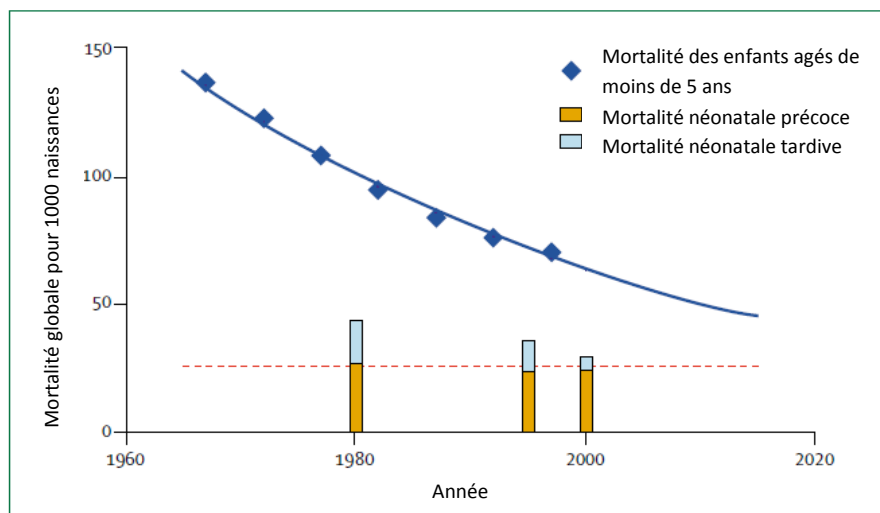
3) Les réponses T CD4+ chez le nouveau-né

a) Généralités sur les défenses immunitaires du nouveau-né

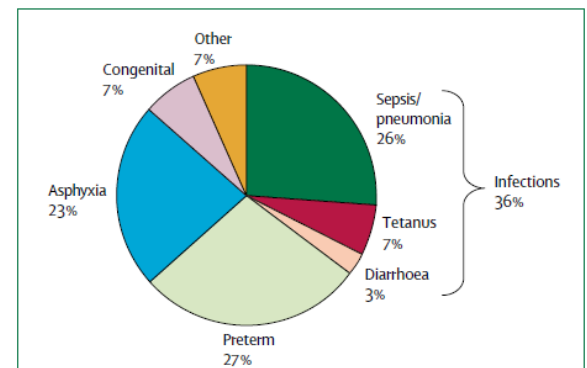
La période néonatale qui est définie comme la première semaine chez la souris et le premier mois chez l'être humain (Adkins et al., 2004) est une période critique tant sur le plan du développement physique et cognitif que sur le développement des réponses immunitaires. En effet, c'est durant cette période que le nouveau-né va être en contact pour la première fois avec de grandes quantités d'antigènes environnementaux. Son système immunitaire va alors avoir la tâche extrêmement importante de distinguer les antigènes nocifs des antigènes inoffensifs afin de mettre en place la réponse la mieux adaptée. La sensibilité des nouveau-nés tant aux infections qu'aux maladies allergiques est un problème majeur de santé publique et nécessite de mieux comprendre le système immunitaire néonatal afin d'agir précocement pour améliorer ses réponses immunitaires.

➤ La sensibilité aux infections

Chaque année, quatre millions d'enfants meurent au cours de leur premier mois de vie. Les causes principales de décès précoces sont les naissances avant-terme (28%), l'asphyxie (23%) et les infections sévères (36%) dont la septicémie et la pneumonie (26%), le tétanos (7%) et la diarrhée (3%) contre lesquelles les nouveau-nés ne parviennent pas à se défendre (voir Figure 5). Le taux particulièrement élevé de décès dus aux infections met en évidence un défaut majeur d'immunité efficace chez le nouveau-né. Les deux-tiers des décès en période néonatale surviennent en Afrique et en Asie du Sud. 10 pays regroupent les deux-tiers des décès précoces. Des programmes de survie de l'enfant mis en place dans les pays en voie de développement et se concentrant sur les maladies infantiles telles que la pneumonie, la diarrhée ou la malaria ont entraîné une baisse d'un tiers des décès entre 2 et 5 ans entre les années 1980 et 2000. Bien que des progrès remarquables aient été accomplis au cours des dernières décennies dans la réduction mondiale du nombre de décès chez les enfants, la baisse des taux de mortalité néonatale a été beaucoup plus lente (aucune baisse du taux de mortalité néonatale au cours des vingt dernières années). Pourtant, 38% des décès survenant avant l'âge de 5 ans ont lieu au cours du premier mois de vie et 28% au cours de la première semaine, d'où l'importance majeure de se concentrer sur cette période cruciale (Lawn et al., 2005).



Mortalité infantile chez les enfants âgés de moins de 5 ans et dans le 1^{er} mois de vie entre 1965 et 2015



Distribution estimée des causes directes de mortalité des 4 millions de morts néonatales au cours de l'année 2000 (Basée sur l'étude de 147 pays)

Figure 5: Mortalité infantile due aux infections

D'après "4 million neonatal deaths: when? Where? Why?" Lawn et al, Lancet, 2005

La plupart des infections, spécialement chez l'enfant, surviennent via les muqueuses au niveau du poumon, de l'intestin ou du tractus urinaire. Ces vastes surfaces muqueuses semblent donc avoir un manque majeur de protection chez le nouveau-né. Parmi les infections bactériennes, on peut citer l'infection aux streptocoques du groupe B, qui intervient suite à la transmission maternelle de ces bactéries au cours de l'accouchement, et la listeriose, qui intervient si la mère est elle-même infectée. Ces deux types d'infections peuvent induire une septicémie, une pneumonie ou une méningite (Baker, 2013; Jackson et al., 2010). Les infections à E. coli sont également très fréquentes chez le nouveau-né et entraînent des infections urinaires et des septicémies (Stoll et al., 2011). Parmi les infections virales, il est important de noter l'infection au HSV (Herpes simplex virus) qui est rare mais avec un impact dévastateur sur le système nerveux central en absence de traitement (Brown, 2004), les entérovirus et le RSV (respiratory syncytial virus), qui est à l'origine des bronchiolites et joue un rôle important dans la pathogénèse de l'allergie respiratoire et de l'asthme (You et al., 2006). La plus grande sensibilité des nouveau-nés aux infections peut être expliquée par différentes hypothèses: le manque de mémoire immunologique préexistante, le faible nombre de cellules immunitaires ou encore les différentes proportions et les différences phénotypiques des cellules immunitaires entre le nouveau-né et l'adulte (Adkins et al., 2004). Même si le nouveau-né a longtemps été considéré comme incapable de répondre de manière efficace aux agressions, il semblerait que le système immunitaire du nouveau-né soit plutôt compétent mais inadapté. Les réponses immunitaires du nouveau-né sont très variables, allant de l'ignorance et d'une absence de réaction à une réponse complètement fonctionnelle mais inadaptée, voire même indésirable. En effet, en plus des infections qui touchent fréquemment les nouveau-nés, les réponses allergiques se développent également très tôt chez l'enfant.

➤ **Le développement d'allergies**

L'allergie est une réaction immunitaire inappropriée de l'organisme contre un antigène de l'environnement normalement inoffensif, qu'on appelle alors allergène. Le mécanisme précis de l'allergie sera décrit dans le chapitre sur les maladies allergiques. Pour résumer, il s'agit d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes Th2, induisant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'IgE. L'allergie se déclare dans la plupart des cas chez l'enfant et le jeune adulte, dès les premiers contacts avec l'allergène (voir Figure 6). La prévalence des allergies a constamment augmenté au cours des 50 dernières années avec une augmentation massive des allergies à partir des années 1990. L'occidentalisation du mode de vie a été avancée afin d'expliquer cette augmentation des allergies à savoir : un changement de l'alimentation, une amélioration de l'hygiène et un contact plus important avec des polluants de toute sorte (gaz d'échappement, tabagisme, pesticides...) (Devereux, 2006). Même si ces maladies sont rarement mortelles (un à trois cas par million d'habitant par an), elles ont un impact majeur sur la vie quotidienne et nécessitent une adaptation majeure de l'enfant et de sa famille, et des traitements symptomatiques souvent lourds et contraignants.

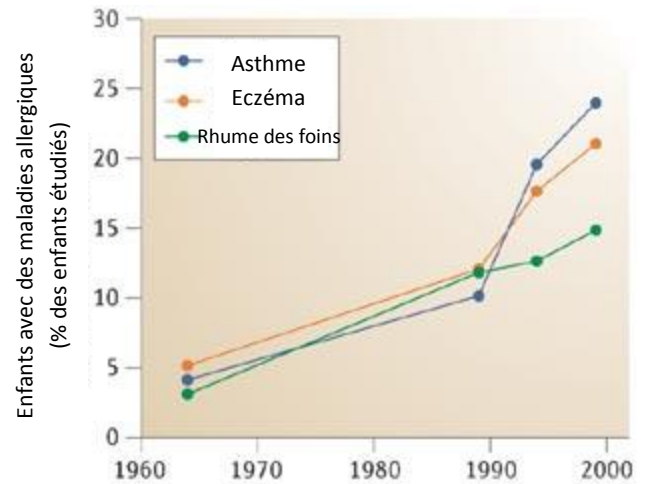
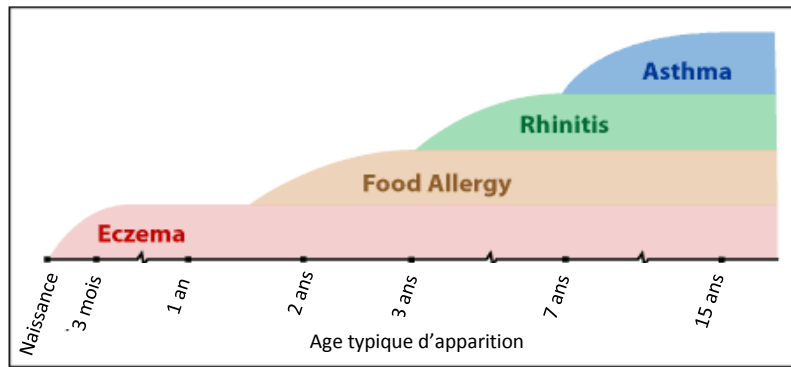


Figure 6: Premières manifestations allergiques et augmentation de la prévalence des allergies au cours des 50 dernières années

D'après "The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought", Devereux, Nature reviews immunology, 2006

La première apparition des symptômes allergiques a généralement lieu pendant l'enfance. La prévalence des maladies allergiques a constamment augmenté depuis 50 ans avec une augmentation massive depuis les années 1990.

Le nouveau-né et par extension l'enfant en bas âge doit donc à la fois lutter contre des infections majeures face aux antigènes nocifs qu'il rencontre sans toutefois développer des réponses immunitaires inappropriées contre les antigènes inoffensifs. Or, la prévalence très élevée des infections et des allergies en tout début de vie nous laisse supposer que le système immunitaire du nouveau-né semble avoir des difficultés majeures à induire une réponse efficace et surtout appropriée contre les antigènes qu'il rencontre. Afin de mieux comprendre les réponses immunitaires du nouveau-né, il semble essentiel de connaître son développement. Ma thèse s'étant concentrée sur les réponses immunitaires de la souris, je mettrai ici en avant les connaissances obtenues sur le système immunitaire murin en évoquant régulièrement les connaissances obtenues sur le système immunitaire humain.

b) Le développement du système immunitaire

Bien qu'il y ait des différences bien connues entre le développement du système immunitaire humain et celui du rongeur, les rongeurs ont depuis longtemps été déterminés comme l'organisme le mieux approprié à l'étude du système immunitaire (Holsapple et al., 2003). La majeure différence entre les deux espèces semble être un délai global de maturation du système immunitaire de la souris. Ainsi, une souris de 7 jours correspondrait à un nouveau-né humain (Adkins et al., 2004). La mise en place d'un système immunitaire fonctionnel nécessite une séquence organisée et coordonnée d'événements développementaux débutant très tôt dans la période fœtale et se poursuivant tout au long de la période néonatale. Le système immunitaire se développe à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC) pluripotentes générées au niveau du mésenchyme intra-embryonnaire très tôt au cours de la gestation (8^{ème} jour)(Cumano and Godin, 2001). Ces cellules ont la capacité de se

différencier dans toutes les classes de cellules sanguines et immunitaires. C'est également à ce moment-là, (jour 8,5) que se met en place la circulation sanguine embryonnaire. Ces cellules HSC vont peu à peu se différencier en différentes lignées cellulaires à l'origine de tous les types cellulaires circulant et migrer vers les différents tissus. La génération des cellules progénitrices lymphoïdes et myéloïdes nécessite la migration de ces cellules vers le foie fœtal à 10 jours où une intense prolifération va avoir lieu. Contrairement à l'Homme où la génération des précurseurs lymphocytaires a lieu in situ, chez la souris, la présence de lymphocytes au niveau du foie fœtal n'est mise en évidence qu'après le 18^{ème} jour et seulement après la génération des précurseurs lymphocytaires au niveau de la moelle osseuse. Les cellules progénitrices lymphoïdes vont ensuite migrer du foie fœtal et se relocaliser au niveau du thymus et de la moelle osseuse. Ces deux derniers organes sont les organes primaires de lymphopoïèse et semblent être les uniques organes à apporter le microenvironnement nécessaire au développement de cellules fonctionnellement immunocompétentes. Il est important de noter que le développement du système immunitaire ne s'arrête pas à la naissance et des cellules immunocompétentes continuent d'être produites tout au long de la vie à partir de cellules progénitrices au niveau de la moelle osseuse et du thymus. Le thymus se développe à partir du 10^{ème} jour et les cellules progénitrices lymphoïdes vont le coloniser à partir du 11^{ème} jour. Même si on retrouve encore quelques cellules progénitrices dans le thymus au cours de la gestation, la majorité des cellules immigrantes se différencient immédiatement en lymphocytes immatures. Sous l'influence des cellules épithéliales thymiques, les lymphocytes en développement acquièrent l'expression du récepteur T, du CD3, du CD4 et du CD8. Ces cellules double-positives CD4-CD8 vont ensuite perdre l'expression d'un des deux marqueurs. C'est à ce moment-là qu'a lieu la sélection négative des lymphocytes T reconnaissant le soi et la sélection positive des lymphocytes T capables de répondre efficacement aux antigènes étrangers via la reconnaissance du CMH. Ces lymphocytes T vont ensuite pouvoir migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. A 13 jours, les cellules progénitrices lymphoïdes et myéloïdes sont également retrouvées au niveau de la rate et une réserve de ces cellules va y rester tout au long de la gestation et au cours de la vie post-natale. Cependant, la lymphopoïèse n'aura jamais lieu au niveau de la rate et les lymphocytes présents au niveau de la rate seront uniquement des lymphocytes matures générés au niveau du thymus. Enfin, la dernière étape est la génération de la moelle osseuse à l'intérieur des os comme l'organe hématopoïétique primaire. Elle n'a lieu qu'à partir de 17 jours suite à la minéralisation des os qui intervient tardivement. L'ordre dans lequel ces deux événements interviennent n'est d'ailleurs pas encore clairement établi. La moelle osseuse assume très rapidement la fonction d'hématopoïèse primaire à partir du jour 18 et persiste tout au long de la vie post-natale. La cavité de la moelle osseuse est colonisée par des cellules HSC qui resteront la première réserve de cellules pluripotentes hématopoïétiques tout au long de la vie. Les lymphocytes B quant à eux sont générés dans la moelle osseuse et apparaissent dans le foie, la rate et la moelle osseuse à partir du 18^{ème} jour.

Après la naissance, les cellules hématopoïétiques présentes au niveau du foie fœtal disparaissent immédiatement et le foie commence à assumer ses fonctions principales de stockage, nutrition et détoxification. Les cellules immunitaires sont générées au niveau de la moelle osseuse et, excepté pour les lymphocytes, complètent leur maturation in situ. Les lymphocytes T poursuivent leur maturation dans le thymus alors que les lymphocytes B se différencient dans les tissus puis retournent à la moelle osseuse pour se différencier en plasmocytes. L'hématopoïèse splénique persiste pendant quelques semaines puis disparaît. La preuve indiscutable que le système immunitaire murin continue à se développer après la naissance est l'impact capital d'une thymectomie post-natale sur le

développement des réponses immunitaires. Cette thymectomie mène à des syndromes auto-immuns massifs entraînant fréquemment la mort. Au contraire, chez l'Homme, la thymectomie est réalisée en routine chez les enfants transplantés cardiaques lors des premiers jours de vie sans aucun impact sur leurs défenses immunitaires ultérieures.

Après la naissance, l'exposition aux antigènes devient significative et impacte de manière importante le développement des réponses immunitaires. Ainsi la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal à la naissance permet de mettre en place un développement lymphoïde harmonieux contrairement aux souriceaux nés sans exposition microbienne. Les souriceaux sans exposition microbienne ont également un déficit en immunoglobulines majeur. Enfin, après avoir interagit avec son fœtus par voie intra-utérine, la mère continue d'avoir un impact majeur sur le développement du système immunitaire du nouveau-né via le lait maternel. Chez l'Homme, la méthode d'accouchement et l'introduction des différents aliments jouent également un rôle majeur sur le développement des réponses immunitaires.

c) Historique des connaissances sur les réponses immunitaires du nouveau-né

➤ **La tolérance**

Le système immunitaire du nouveau-né a longtemps été considéré comme immature et propice à l'induction de tolérance. Tout a commencé en 1945 avec les observations d'Owen selon lesquelles des jumeaux dizygotiques possédaient à l'âge adulte des cellules sanguines qui leur sont propres mais également des cellules sanguines provenant de leur jumeau (Owen, 1945). Des cellules embryonnaires hématopoïétiques ont été capables de s'implanter dans le tissu hématopoïétique du co-jumeau et de continuer à produire des cellules sanguines tout au long de la vie. Ces cellules sont donc acceptées comme une partie du soi. Par la suite, l'équipe de Medawar (Billingham et al., 1953) confirma cette hypothèse en démontrant que des souriceaux de souche CBA injectés peu avant la naissance avec des cellules hématopoïétiques provenant d'une souris adulte de souche génétique différente (A) étaient capables à l'âge adulte d'accepter une greffe provenant de cette même souche (plus de 70 jours contrairement à une dizaine de jours dans une souris non injectée à la naissance). Deux hypothèses ont alors été avancées. D'une part, la tolérance néonatale pourrait être due à un déficit de lymphocytes T matures qui seraient donc incapables de rejeter les cellules du donneur. Ces cellules seraient alors acceptées par l'organisme comme une partie du « soi ». Cette hypothèse a été définie comme tolérance « passive ». D'autre part, les lymphocytes T du nouveau-né pourraient être biaisés vers un type suppressif qui protégerait activement contre le rejet des cellules du donneur. Cette hypothèse a elle été définie comme tolérance « active ». Ceci mit en évidence la période in utero et néonatale comme une période propice à l'induction de tolérance vis-à-vis d'antigènes du « non-soi » afin d'éviter la mise en place de réponses immunitaires effectrices délétères.

➤ **L'importance des conditions d'immunisation**

Suite à ce dogme d'absence de réponses effectrices chez le nouveau-né, d'autres équipes ont plus tard démontré la capacité du nouveau-né à induire des réponses de type effectrices pro-inflammatoires si certaines conditions étaient réunies (Miller et al., 1994). Trois études parues en 1996 ont finalement mis en évidence, chez la souris, la possibilité d'induire des réponses immunitaires efficaces chez le nouveau-né en agissant sur les conditions d'immunisation. Tout d'abord, la première observation fut que le nouveau-né était capable d'induire une réponse effectrice en fonction des signaux de danger

envoyés par les cellules présentatrices d'antigène (APC). L'expression des molécules co-stimulatrices et la quantité d'APC seraient donc des facteurs essentiels de la qualité de la réponse immunitaire (Ridge et al., 1996). La deuxième étude mit en évidence que la dose d'antigène jouait un rôle majeur dans l'induction des réponses immunitaires, une faible dose de virus induisant une réponse effectrice efficace alors qu'une dose comparable à celle utilisée pour l'adulte induirait une réponse de type 2 non protectrice (Sarzotti et al., 1996). Cette étude mit pour la première fois en évidence le possible biais Th2 des réponses immunitaires néonatales. Enfin, la dernière démonstration établit que lorsque les souris étaient injectées en période néonatale dans des conditions connues pour induire de la tolérance, des cellules mémoires restaient présentes au niveau de la rate et induisaient une réponse effectrice efficace lors de l'exposition ultérieure à l'antigène. Ceci remet en question la capacité à induire de la tolérance chez le nouveau-né. Le type de réponse effectrice induite (Th1 ou Th2) dépendait ici des conditions d'immunisation même si la encore, la réponse Th2 semblait fortement privilégiée (Forsthuber et al., 1996). La tolérance observée dans l'article de Medawar ne serait donc pas la voie par défaut induite chez le nouveau-né mais un ensemble de conditions réunies pour donner les résultats observés. Les différentes études citées ci-dessus démontrent la capacité du nouveau-né à induire des réponses immunitaires effectrices de tout type. Cependant, il apparaît que lorsque les conditions d'immunisation ne sont pas adaptées au nouveau-né mais similaires à celles utilisées chez l'adulte (dose, adjuvant...), le nouveau-né développe préférentiellement une réponse de type Th2.

➤ Le biais Th2

Suite à ces découvertes, de nombreuses études chez la souris se sont appliquées à étayer ce biais Th2. Premièrement, en réponse à des formes variées de vaccins, les lymphocytes B et T peuvent répondre de manière efficace mais avec un biais Th2 (sécrétion d'IL-5, faible sécrétion d'IFN- γ , peu d'IgG2a et une faible activité cytotoxique (Barrios et al., 1996b). Même si les nouveau-nés peuvent mettre en place des réponses de type Th1 ou Th2, ils développent préférentiellement des réponses primaires et secondaires de type Th2 qui persistent à l'âge adulte (Adkins et al., 2001; Adkins and Du, 1998). Ce biais Th2 induirait donc un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur d'une réponse inefficace pour lutter contre les infections.

Parallèlement, d'autres études ont mis en évidence la possibilité de lutter contre ce biais Th2 bien établi et possiblement délétère pour le nouveau-né en utilisant la plasticité du système immunitaire du nouveau-né et la possible induction de réponses de type Th1 en fonction des conditions d'immunisation (voir Figure 7). Comme énoncé précédemment, une dose plus faible d'antigène et donc mieux adaptée au faible nombre de cellules immunitaires présent chez le nouveau-né va pouvoir induire une réponse de type Th1 efficace (Sarzotti et al., 1996). L'utilisation d'adjuvants connus pour être de puissants inducteurs de réponse Th1 permet aussi d'induire une réponse de type Th1 efficace (Barrios et al., 1996a). Enfin, l'utilisation de vaccins à ADN induisant une réponse de type Th1 chez l'adulte a été démontrée comme efficace chez le nouveau-né, permettant ainsi d'induire une protection active chez le nouveau-né (Martinez et al., 1997). Ainsi, si le nouveau-né semble spontanément biaisé vers des réponses de type Th2, il est aussi capable de les diriger vers des réponses de type Th1 en fonction des conditions dans lesquelles l'antigène lui est présenté (Adkins et al., 2004). Cependant, lorsque le nouveau-né est exposé à des doses environnementales de virus ou de bactéries, il n'est pas toujours capable de se défendre efficacement, d'où les taux importants de mortalité infantile dus aux infections. De plus, il apparaît important de prendre en compte ces informations lors

de l'immunothérapie et de la vaccination afin d'adapter les conditions d'exposition du nouveau-né pour que son système immunitaire puisse réagir de la bonne manière.

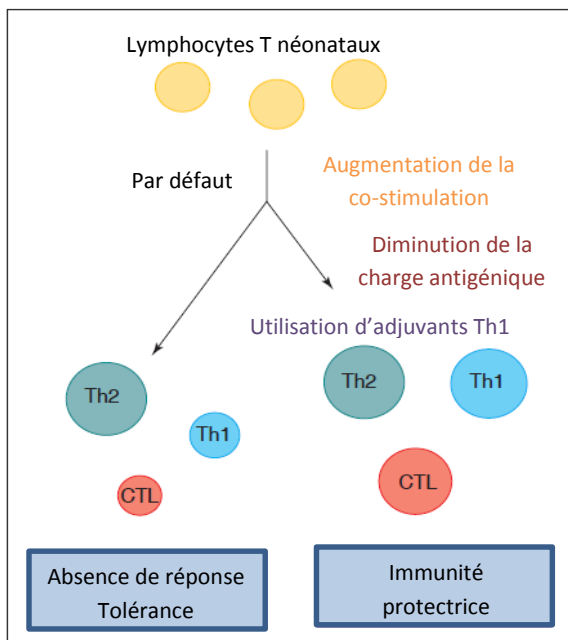


Figure 7: Biais Th2 et réponses Th1 néonatales

D'après « T-cell function in newborn human and mice », Adkins et al, Immunology today, 1999

Quand le nouveau-né rencontre l'antigène dans des conditions neutres, son système immunitaire va préférentiellement générer une réponse de type Th2, une faible réponse Th1 non protectrice et peu de composés cytolytiques. Lorsque les conditions d'immunisation sont réunies (par exemple en présence d'adjuvant Th1), le système immunitaire néonatal est également capable de générer une réponse Th1 efficace, permettant ainsi une immunité protectrice.

Chez l'Homme, des études ont aussi démontré un défaut de réponse de type Th1 et un biais vers des réponses de type Th2 chez le nouveau-né (Marodi, 2002). Cependant, des études ont aussi démontré que l'exposition à *Bordetella pertussis*, naturellement ou par vaccin permettait d'induire des réponses de type Th1 (Ryan et al., 1997a; Ryan et al., 1997b) ; L'exposition à un antigène in utero peut induire de manière équivalente une réponse de type Th1 lorsqu'il s'agit d'une exposition à une mycobactérie (Malhotra et al., 1997) ou une réponse de type Th2 lorsqu'il s'agit d'un helminthe ou d'un antigène environnemental classique (Prescott et al., 1998). Ainsi, comme chez la souris, le nouveau-né semble biaisé vers des réponses de type Th2 avec la possibilité d'induire aussi des réponses de type Th1.

d) Les spécificités immunitaires du nouveau-né

➤ **Les cellules dendritiques**

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des réponses immunitaires inadaptées du nouveau-né, la littérature s'est notamment intéressée aux cellules dendritiques. Une hypothèse intéressante afin d'expliquer les défauts des réponses immunitaires néonatales serait un dysfonctionnement de ces cellules.

La première hypothèse avancée est une absence de cellules dendritiques en tout début de vie. Avant la caractérisation des cellules dendritiques, certains auteurs ont mis en évidence une présence de cellules porteuses du CMH II en tout début de vie, dès le 3^{ème} jour, dans le thymus mais pas en périphérie, où elles n'apparaissent qu'à partir de la deuxième semaine (Lu et al., 1980). Des études ultérieures ont cependant démontré la présence de cellules dendritiques dès le tout début de vie dans

le thymus mais également dans la rate et les ganglions lymphatiques, même si leur nombre est beaucoup plus faible (Dakic et al., 2004). Il est également important de noter que le pourcentage de cellules dendritiques au sein de ces organes est différent selon les organes lymphoïdes considérés : ainsi, on note une augmentation du pourcentage de cellules dendritiques de 0,2% au 1^{er} jour de vie à 3% à l'âge adulte dans la rate alors que dans les ganglions lymphatiques, la tendance est inversée avec, au contraire, une diminution du pourcentage de cellules dendritiques au cours de l'ontogénie d'environ 3,5% à 1,2%. D'autres études ont également confirmé la présence de cellules dendritiques en tout début de vie avec un nombre moins élevé de cellules dendritiques chez le nouveau-né que chez l'adulte (de 12 à 50 fois moins de cellules dendritiques), ce qui corrèle avec un développement des organes lymphoïdes au cours de l'ontogénie (Sun et al., 2003).

La deuxième hypothèse est un défaut de présentation de l'antigène via un défaut d'expression du CMH II qui résulte en une faible activation des lymphocytes T CD4⁺. L'analyse de la fonctionnalité des cellules dendritiques a également donné lieu à des résultats controversés (Willems et al., 2009). La première étude mettant en avant ce concept intervient avant la caractérisation des cellules dendritiques, dans une étude portant sur les macrophages (Lu et al., 1979). Ainsi, dans cette étude, les macrophages néonataux ne présentent pas efficacement l'antigène, ce qui résulte d'une faible expression du CMH II. Une autre étude a ensuite confirmé l'hypothèse de l'immaturité des cellules dendritiques, mettant en évidence une faible capacité à présenter l'antigène, et donc à induire une réponse effectrice. Cette capacité à présenter l'antigène augmente au cours du développement n'atteignant la capacité des adultes qu'à partir de la 4^{ème} semaine de vie (Muthukkumar et al., 2000). Cependant les cellules CD11c purifiées dans ce modèle ne sont qu'à 10% des cellules dendritiques. En effet, la majeure partie de ces cellules expriment fortement le F4/80 et le CD11b (marqueurs généralement exprimés par les macrophages) et le Ly6G (marqueurs des neutrophiles). Il apparaît donc que les résultats de cette étude sont très critiquables. D'autres études ont d'ailleurs ensuite démontré que, contrairement à l'étude citée précédemment, les cellules dendritiques exprimaient des niveaux de CMH II et de molécules co-stimulatrices similaires à ceux observés chez l'adulte et étaient capables de s'activer à la suite d'une stimulation non-spécifique à la fois in vitro et in vivo (Dadaglio et al., 2002; Sun et al., 2003). L'étude de Dadaglio et al. démontre une capacité des cellules dendritiques néonatales à s'activer suite à une stimulation avec du LPS et à présenter efficacement un antigène viral via le CMH de type I aux lymphocytes T CD8⁺. Dans l'étude de Sun et al, la stimulation des cellules dendritiques néonatales in vitro avec du CpG induit une sécrétion d'IL-12 et l'injection de CpG à des souris nouveau-nés induit une activation des cellules dendritiques comparable à celle observée chez l'adulte avec une régulation positive de l'expression du CMH II et des molécules co-stimulatrices. Au contraire, Dakic et al. ont mis en évidence un défaut de sécrétion des cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN- γ par les cellules dendritiques néonatales, évoquant les différentes stimulations utilisées afin d'expliquer les différences observées par rapport à l'étude de Sun et al. L'étude de Dakic et al. a également mis en évidence un défaut de capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺. En effet, la capacité des cellules dendritiques néonatales à présenter un antigène d'ovalbumine et à induire une réponse des lymphocytes T CD4⁺ reconnaissant spécifiquement cet antigène est déficiente chez les nouveau-nés (Dakic et al., 2004). En conclusion, même si les résultats obtenus sont légèrement contradictoires, les cellules dendritiques néonatales semblent avoir la même capacité que les adultes à s'activer et à exprimer les molécules nécessaires à leur activation et leur fonction mais semblent cependant avoir un défaut dans la voie de capture/dégradation/présentation de l'antigène nécessaire à l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Chez l'Homme, la capacité de présentation de l'antigène semble également

déficiente chez le nouveau-né. Les différentes études ayant étudié les cellules dendritiques néonatales mettent en évidence une expression de marqueurs d'immaturité et une faible sécrétion de cytokines. Cependant, l'utilisation de différentes techniques expérimentales rend la comparaison et donc la validation des résultats obtenus dans les différentes études très difficile. De plus, la possibilité que des facteurs maternels puissent interagir sur le développement des cellules dendritiques du nouveau-né rend l'utilisation de sang de cordon, en grande majorité utilisé dans ces études, controversé. (Velilla et al., 2006).

Une troisième hypothèse impliquant les cellules dendritiques serait des différences phénotypiques au sein des cellules dendritiques néonatales. De même que pour l'étude de la capacité de présentation, l'analyse phénotypique des cellules dendritiques dépend également des marqueurs choisis par les auteurs. En effet, au fil des ans, la mise en évidence de marqueurs de plus en plus spécifiques a induit un continuel renouvellement dans l'analyse des cellules dendritiques. De plus, les méthodes de purification des cellules dendritiques se sont également modifiées passant d'une méthode par gradient de densité à une sélection positive ou négative par billes magnétiques pour finir par une analyse multifactorielle par cytométrie en flux sans purification préalable. Malgré ces différences, la grande majorité des études démontre qu'il existe une proportion différente des sous-populations de cellules dendritiques au cours de l'ontogénie. A la naissance, les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont présentes en majorité pour ensuite devenir de moins en moins importantes au cours des trois premières semaines de vie (Sun et al., 2003). Au niveau de la rate, les cellules dendritiques exprimant le CD8 et le CD4 sont absentes en tout début de vie. Les cellules dendritiques CD8⁺ se développent très rapidement pour atteindre leur niveau maximal à la fin de la première semaine alors que les cellules dendritiques CD4⁺ se développent plus progressivement et deviennent de plus en plus majoritaires au cours du temps (pour atteindre 50% à l'âge adulte alors que les CD8⁺ représentent 25% des cellules dendritiques totales) (Dakic et al., 2004). Parmi les cellules dendritiques CD8⁺, l'expression du marqueur CD205 permet de les différencier. Chez l'adulte, la majeure partie des cellules dendritiques est CD8⁻ CD205⁻ (75%) alors que les cellules dendritiques CD8⁺ CD205⁺ ne représentent que 25% des cellules dendritiques totales. Chez le nouveau-né, les cellules dendritiques CD8⁻ CD205⁻ ne représentent qu'une petite partie des cellules puisque la majeure partie des cellules dendritiques sont CD8⁻ mais expriment également le CD205. Elles vont ensuite acquérir le marqueur CD8 ou perdre l'expression du CD205 au cours de l'ontogénie afin de se répartir à l'âge adulte entre les deux sous populations CD8⁺ CD205⁺ et CD8⁻ CD205⁻. Il semblerait donc y avoir une mise en place progressive des différentes sous-populations de cellules dendritiques au cours de l'ontogénie qui est comparable à celle observée chez une souris irradiée et supplémentée avec des cellules précurseurs de la moelle osseuse (Kamath et al., 2000)

La dernière hypothèse, qui découle des deux précédentes est la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques néonatales et donc leur impact sur la différenciation des lymphocytes T. En effet, les réponses immunitaires de type Th1 sont notamment dues à la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques. Cette sécrétion d'IL-12 est majoritairement induite par les cellules dendritiques CD8⁺ CD205⁺ chez l'adulte. Cependant chez le nouveau-né, on note une sécrétion d'IL-12 également par les cellules dendritiques CD8⁻ CD205⁺. L'acquisition progressive de leur phénotype et de leur fonction met en évidence que les cellules dendritiques CD8⁻ CD205⁺ représentent un stade immature des cellules CD8⁺ CD205⁺ qui ne sont pleinement fonctionnelles qu'à partir du 7^{ème} jour. (Wu and Liu, 2007). Cependant la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques CD8⁻ CD205⁺ néonatales est beaucoup plus faible que celle induite par les cellules dendritiques CD8⁺ CD205⁺. Ainsi, ce défaut fonctionnel pourrait

expliquer en partie le biais Th2 et le défaut de réponse Th1 observés chez les nouveau-nés (Lee et al., 2008). En effet, lorsque les nouveau-nés sont supplémentés avec des cellules dendritiques sécrétant de l'IL-12, ils sont tout à fait capables d'induire des réponses de type Th1 en réponse à un antigène. Par contre, lorsque la même expérience est réalisée avec des cellules dendritiques adultes provenant de souris KO pour l'IL-12, les nouveau-nés ne parviennent plus à induire des réponses Th1 efficaces. L'apparition des cellules dendritiques CD8⁺ CD205⁺ semble donc être une étape majeure de l'acquisition de la capacité à induire des réponses Th1. De plus, il apparaît que l'environnement néonatal joue également un rôle majeur sur la fonction des cellules dendritiques et le bon développement des réponses T. Ceci a été mis en évidence dans une étude démontrant qu'en conditions pro-inflammatoires activant le TLR9, la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B du nouveau-né empêche la sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques, induisant un déficit de réponse Th1 (Sun et al., 2005). Chez l'Homme, le biais Th2 a également été expliqué par un déficit de l'expression de l'IL-12 par les cellules dendritiques. Ainsi, un déficit de l'expression du gène IL-12(p35) au niveau des cellules dendritiques du nouveau-né (Goriely et al., 2001) a été mis en évidence puis le déficit de sécrétion d'IL-12 par les cellules dendritiques a été confirmé, induisant un défaut de sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T (Langrish et al., 2002).

Les cellules dendritiques du nouveau-né semblent donc avoir des caractéristiques bien particulières et acquérir progressivement un phénotype plus mature au cours de l'ontogénie. Ceci permet d'expliquer en partie l'inefficacité des réponses immunitaires néonatales.

➤ Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs

En plus des particularités majeures des cellules dendritiques néonatales, les lymphocytes T néonataux semblent également avoir des caractéristiques intrinsèques permettant d'expliquer le dysfonctionnement du système immunitaire du nouveau-né. Premièrement, chez la souris nouveau-née, le nombre de lymphocytes T est plus bas que chez l'adulte. Par conséquent, les nouveau-nés sont considérés comme lymphopéniques. Chez le nouveau-né, comme chez l'adulte lymphopénique, l'administration d'un nombre fixe de lymphocytes T adultes CD4⁺ comme CD8⁺ va induire une prolifération spontanée homéostatique de ces lymphocytes T (Min et al., 2003) en absence de stimulation antigénique, confirmant ainsi le nombre limité de lymphocytes T chez le nouveau-né.

- La balance Th1/Th2

Concernant le biais Th2 néonatal, même si les deux types de lymphocytes T primaires Th1 et Th2 se développent à la naissance, l'exposition à un antigène induit préférentiellement une réponse de type Th2 et une apoptose des lymphocytes Th1. Ceci est dû à la surexpression de la chaîne $\alpha 1$ du récepteur à l'IL-13 et de la chaîne α du récepteur à l'IL-4 à la surface des lymphocytes Th1 capables de s'hétéro-dimériser et qui déstabilise la balance entre facteurs pro et anti apoptotiques résultant dans l'apoptose des lymphocytes Th1 et un biais Th2 (Li et al., 2004). Au contraire la neutralisation de l'IL-4 empêche l'apoptose des lymphocytes Th1 et restaure des réponses médiées par l'IFN- γ . De même, l'absence d'exposition microbienne en début de vie réduit la déméthylation et donc l'activation du gène de l'IFN- γ dans les lymphocytes T naïfs, ce qui résulte en une augmentation des réponses Th2 et donc du risque allergique en début de vie (Vuillermin et al., 2009)

Les lymphocytes T CD4⁺ néonataux sont également directement capables de sécréter de l'IL-4 et de l'IL-13 après seulement 24h de stimulation alors que les lymphocytes T CD4⁺ adultes nécessitent au

moins 3 jours de différenciation Th2 pour sécréter des quantités comparables de cytokines et seulement après une prolifération extensive (Rose et al., 2007). Les gènes codant pour les cytokines Th2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 sont regroupés au niveau d'un locus appelé « locus Th2 ». Dans les lymphocytes T adultes naïfs, ce locus est inaccessible et quiescent. Lorsque les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en Th2, différentes étapes d'épigénétique ont lieu permettant l'accès à ce locus (Agarwal and Rao, 1998) : l'apparition de sites de sensibilité à la DNase1 (Takemoto et al., 1998), une modification de l'acétylation des histones (Avni et al., 2002), et une déméthylation du locus Th2 (Lee et al., 2002). La sécrétion rapide des cytokines Th2 par les lymphocytes T néonataux pourrait donc être également due à des modifications épigénétiques du locus Th2. Par exemple, une hypométhylation a été observée chez le nouveau-né au niveau du CNS-1 (Rose et al., 2007), un co-régulateur et activateur de l'expression des cytokines Th2 et plus particulièrement de l'IL-4, également déméthylé au cours de la différenciation Th2 (Guo et al., 2002).

Ces modifications épigénétiques propres aux lymphocytes Th2 et Th1 néonataux ainsi que la sensibilité des lymphocytes Th1 à l'apoptose pourraient expliquer le biais Th2 observé chez le nouveau-né (Zaghouani et al., 2009)

- Les lymphocytes Th17

La balance Th1/Th2 dérégulée chez le nouveau-né pose la question de la réponse Th17 néonatale. Une première étude a mis en évidence qu'il était possible d'induire des cellules Th1/Th17 suite à l'administration de myéline chez le nouveau-né mais que ces cellules sécrétaient moins d'IL-17 et étaient moins actives permettant ainsi de prévenir le développement d'encéphalite auto-immune expérimentale (Hofstetter et al., 2007). Ce défaut d'induction des réponses Th17 chez le nouveau-né a ensuite été confirmé dans un modèle d'infection à streptocoques. Cette étude a également mis en avant un défaut des cellules présentatrices d'antigènes du nouveau-né à induire une réponse de type Th17 (Bogaert et al., 2009). Le biais Th2 observé chez le nouveau-né permet d'expliquer ce défaut d'induction de réponse Th17 puisque l'IL-4 est une cytokine inhibitrice de la génération des lymphocytes Th17 (Weaver et al., 2007). Ainsi, une déprivation en IL-4 permet d'induire une réponse Th17 responsable en grande partie du rejet de cellules allogéniques injectées en période néonatale (Debock et al., 2012). De même, l'administration d'anti IL-25, cytokine pro-Th2, en période néonatale induit une réponse Th17 suite à une infection pulmonaire virale (Siegle et al., 2011). Cependant, de manière comparable à la réponse Th1, la réponse Th17 peut être induite chez le nouveau-né grâce à l'utilisation d'adjuvants pro-Th17 (Kamath et al., 2009). En conclusion, le biais Th2 observé chez le nouveau-né induit un déficit à la fois de réponse Th1 et Th17, pouvant ainsi expliquer le défaut de protection contre les infections observées chez le nouveau-né. La possibilité d'induire des réponses Th1 et Th17 grâce à l'utilisation d'adjuvants forts ou de conditions particulières apporte cependant une voie possible d'adaptation notamment de la vaccination aux particularités néonatales.

➤ Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

La thymectomie des nouveau-nés âgés de trois jours conduit à une augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes. Cette auto-immunité peut être empêchée par l'administration aux nouveau-nés de lymphocytes T régulateurs CD25⁺. Ceci met en évidence une fuite de cellules auto-réactives dès la naissance du thymus vers la périphérie mais un délai dans la migration des lymphocytes T régulateurs capables de lutter contre le développement de cette auto-immunité. Le transfert de ces

lymphocytes T régulateurs naturels vers la périphérie ne semblerait débuter qu'à partir du 3^{ème} jour de vie (Asano et al., 1996). L'analyse de l'expression de Foxp3 sur les thymocytes au cours de l'ontogénie confirme que cette expression n'est détectable par cytométrie en flux qu'à partir du 6^{ème} jour de vie (Fontenot et al., 2005). Pourtant, d'autres auteurs ont démontré la présence de l'ARN de Foxp3 en périphérie dès 3 jours. Cependant, cette expression de Foxp3 à la fois dans les thymocytes et en périphérie est 2 à 3 fois moins élevée que chez l'adulte (Dujardin et al., 2004). Il faut également noter que chez le nouveau-né, la grande majorité des lymphocytes T régulateurs présents en périphérie proviennent du thymus alors que chez l'adulte seulement 1 à 2% des lymphocytes T régulateurs périphériques proviennent de cette origine (Berzins et al., 1998). Il semble donc évident qu'il y ait des différences de fonctions entre ces deux âges. De plus, lorsque une souris a été thymectomisée à 3 jours, une proportion très importante de cellules CD4⁺ CD25⁺ est retrouvée en périphérie à l'âge adulte indiquant la compensation de l'organisme à l'absence de l'apport de lymphocytes T régulateurs naturels thymiques par la prolifération intensive du pool de lymphocytes T régulateurs déjà présents en périphérie. Il semblerait donc qu'il n'y ait que peu de lymphocytes T régulateurs déjà présents en tout début de vie mais ces lymphocytes T régulateurs auraient la capacité de proliférer en cas de besoin et de fonctionner de façon mature (Dujardin et al., 2004). Ceci explique en partie la disparité interindividuelle des souris capables de développer de l'auto-immunité après une thymectomie néonatale (Kojima and Prehn, 1981). En effet, les souris qui ne développent pas d'auto-immunité après thymectomie à 3 jours ont bien des lymphocytes T régulateurs, même s'ils sont peu nombreux, qui sont en périphérie avant la thymectomie et qui sont capables d'inhiber l'auto-immunité. De même, chez l'Homme, il a également été démontré que les lymphocytes T régulateurs naturels se développent progressivement au cours de l'ontogénie ainsi que leur fonction suppressive et leur expression de Foxp3 au niveau du thymus (Tulic et al., 2012). En conclusion, des lymphocytes T régulateurs naturels sont bien présents dès la naissance mais leur quantité et leur fonction quant à elle n'est pas encore bien établie.

Au niveau de l'induction des lymphocytes T régulateurs, il apparaît que les lymphocytes T des nouveau-nés ont une tendance à se différencier en lymphocytes T régulateurs plus élevée que ceux des adultes. En effet, *in vitro*, lors d'une stimulation classique du TCR, 70% des lymphocytes T néonataux se convertissent en lymphocytes T régulateurs, alors que chez l'adulte seulement 10% des lymphocytes T suivent la même différenciation. Cette conversion est dépendante du TGF- β endogène mais ne nécessite pas d'ajout de TGF- β exogène. Ces lymphocytes T régulateurs induits expriment le Foxp3, sont capables d'inhiber les réponses T et régressent au cours des 2 premières semaines de vie. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par l'injection d'anti CD3 qui induit une augmentation 3 fois supérieure de la fréquence des lymphocytes T régulateurs chez le nouveau-né. De même, l'injection de lymphocytes T néonataux dans une souris génétiquement modifiée pour ne pas avoir de reconversion de son TCR (Rag1^{-/-}), induit une différenciation des lymphocytes T 6 fois supérieure à la même expérience réalisée avec des lymphocytes T adultes. Il semble donc exister une capacité de différenciation en lymphocytes T régulateurs par défaut beaucoup plus élevée chez le nouveau-né (Wang et al., 2010). Il semblerait également que la capacité des lymphocytes T régulateurs à inhiber les réponses à la fois de type Th1 ou Th2 soit totalement efficace sans distinction chez le nouveau-né. Il a été mis en évidence que l'infection à HSV induit des réponses Th1 et CD8 cytotoxique beaucoup moins importantes chez le nouveau-né. Ceci est dû à la génération de lymphocytes T régulateurs au niveau des ganglions drainant le site de l'infection capables d'inhiber les réponses Th1 induites via un mécanisme dépendant du TGF- β (Fernandez et al., 2008). De même la génération de lymphocytes T

régulateurs Foxp3 en période néonatale par l'administration de complexes immuns IgG/antigène par voie orale est capable d'inhiber les réponses de type Th2 allergiques induites à l'âge adulte (Mosconi et al., 2010). Ainsi, les nouveau-nés semblent tout à fait capables d'induire des lymphocytes T régulateurs en période néonatale.

e) Le rôle de l'allaitement dans le développement des réponses immunitaires du nouveau-né

Pendant la période néonatale, les défenses immunitaires du nouveau-né sont donc en constant développement. Durant cette phase de développement essentiel, le lait maternel, qui reste la nourriture physiologique la mieux appropriée aux mammifères, aide le système immunitaire à générer des réponses appropriées et efficaces. Etant donné que le lait maternel est la nourriture obligatoire du nouveau-né murin, il est quasiment impossible d'étudier l'impact de l'absence d'allaitement sur le nouveau-né. Ces études ont donc directement été réalisées chez l'Homme en grande majorité même si quelques-unes ont également été réalisées chez la souris. Même si pour faciliter la lecture, j'ai décidé de subdiviser les différents rôles des molécules présentes dans le lait maternel, souvent ces molécules interagissent et partagent différentes activités.

➤ **Le rôle anti-infectieux du lait maternel**

Il a tout d'abord été mis en évidence que les enfants allaités développaient moins d'infections que les enfants nourris avec du lait synthétique. A la fois dans les pays développés (Duijts et al., 2010; Duijts et al., 2009) et en voie de développement (Carreira et al., 2014; Ladomenou et al., 2010), il existe des preuves concrètes de l'effet protecteur contre les infections de l'allaitement chez l'Homme au cours des 4-6 premiers mois de vie (Golding et al., 1997) (voir Figure 8). Cet effet protecteur a tout d'abord été associé au fait que le lait maternel était stérile contrairement à l'eau potentiellement contaminée nécessaire pour la préparation des formules. Cependant, il est actuellement bien établi qu'en plus d'apporter de nombreuses valeurs nutritives, le colostrum (premier lait) et le lait maternel confèrent également des avantages immunitaires essentiels au nouveau-né et le protègent contre le développement d'infections respiratoires et gastro-intestinales. Ainsi un allaitement exclusif pendant 6 mois avec une intégration progressive des aliments permettrait d'empêcher chaque année 1 million de morts néonatales (Jones et al., 2003; Morrow and Rangel, 2004). Cette protection peut être expliquée par deux types de mécanismes : (1) une protection immunitaire classique apportée par les anticorps maternels et par des composés pouvant agir comme ligands des bactéries et virus et empêcher leur interaction avec le système immunitaire du nouveau-né (2) des molécules permettant la maturation directe du système immunitaire du nouveau-né afin qu'il atteigne son potentiel optimal. Cette protection est immédiate au cours de l'allaitement mais apporte également un bénéfice à long terme puisque l'allaitement et sa durée semblent avoir un impact sur le développement d'infections jusqu'à 10 ans après la période d'allaitement (Silfverdal et al., 1997; Wilson et al., 1998).

Risque relatif de maladies diarrhéiques et d'infections respiratoires sévères en fonction de l'âge et du statut d'allaitement			
	Allaitement exclusif	Allaitement partiel	Pas d'allaitement
Maladies diarrhéiques			
0-3 mois	1.0	4.1	15.1
4-11 mois	NA	1.0	2.2
Infections respiratoires sévères			
0-3 mois	1.0	2.9	4.0
4-11 mois	NA	1.0	2.1

Figure 8: Impact de l'allaitement sur le risque infectieux

D'après "Ecological study of effect of breast feeding on infant mortality in Latin America", Betrán et al, BMJ, 2001

La protection contre les infections apportée par le lait maternel est largement attribuée à la présence dans le lait maternel d'IgA (décrits ci-dessous). Cependant, le lait maternel contient également un grand nombre de composants avec une activité antimicrobienne comme des carbohydrates, des oligosaccharides ou des composés glycosylés tels que des glycoprotéines, des glycolipides ou des mucines (Newburg, 1999). Ces composés glycosylés sont le troisième constituant le plus abondant du lait maternel et contiennent une grande variété de structures. Ces composés glycosylés et plus particulièrement les oligosaccharides ont des homologues avec les récepteurs d'une grande majorité de bactéries et de virus communs. Ainsi, les oligosaccharides vont être utilisés par les pathogènes comme substrats et vont ainsi inhiber les interactions des pathogènes avec les tissus muqueux de l'hôte, le protégeant ainsi de l'infection. De même, des glycoprotéines ont la capacité d'interférer dans les interactions du pathogène avec la muqueuse de l'hôte. C'est le cas, par exemple, de la lactadherine qui inhibe l'infection par les rotavirus (Newburg et al., 1998) ou la mucine qui empêche la liaison des bactéries pathogènes aux cellules intestinales grâce à la présence de résidus d'acide sialique (Schroten et al., 1998). Ces composés glycosylés contribuent donc de manière significative à la protection des tissus muqueux néonataux contre les attaques bactériennes et virales et semblent donc être des acteurs majeurs de la protection contre les infections observée chez les nouveau-nés allaités (Kelly and Coutts, 2000).

Un certain nombre de protéines présentes dans le lait maternel ont également une activité antimicrobienne, résistent à la dégradation protéolytique dans l'intestin et contribuent ainsi à la défense des nouveau-nés contre les bactéries pathogènes et les virus. Ainsi, la lactoferrine qui est la protéine présente en plus grande quantité dans le lait maternel (1-4g/L) (Hanson et al., 2003), possède une forte activité bactéricide, essentiellement grâce au peptide formé au cours de sa digestion, la lactoferricine (Tomita et al., 1991). Elle dégrade les structures protéiques des bactéries pathogènes intestinales nécessaires à leur attachement et à leur invasion, bloquant ainsi l'infection (Plaut et al., 2000). La lactoferrine interagit à cette étape avec le lysozyme lui aussi présent dans le lait maternel et qui va pouvoir accéder à la bactérie et dégrader la matrice intracellulaire, détruisant ainsi le micro-organisme (Ellison and Giehl, 1991). La lactoferrine et le lysozyme du lait maternel ont également été mis en évidence comme protecteur contre des virus tels que HIV (Harmsen et al., 1995; Lee-Huang et al., 1999) et des infections par champignons (Andersson et al., 2000). La lactoferrine a également été démontrée comme une protéine anti-inflammatoire grâce à son inhibition de la sécrétion d'IL-6

(Mattsbj-Baltzer et al., 1996) mais également de la production et de la sécrétion de TNF- α , IL- β et IL-8 via l'activation de la voie de signalisation du NF- κ B (Haversen et al., 2002). Elle joue également un rôle majeur sur le développement de la muqueuse intestinale (Nichols et al., 1987). L'osteoprotégérine, membre de la super famille du TNF est trouvée en grande quantité dans le lait maternel et empêche l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par le TNF, permettant ainsi d'inhiber les réponses pro-inflammatoires (Vidal et al., 2004). D'autres enzymes jouent également un rôle dans l'activité antimicrobienne du lait maternel comme la κ -caséine qui, grâce à ses résidus d'acide sialique empêche l'adhésion de *Helicobacter pylori* à la muqueuse gastrique en mimant un récepteur analogue et en capturant ainsi la bactérie (Stromqvist et al., 1995), la lactoperoxydase qui permet la dégradation de bactéries au niveau de la bouche et du haut du tractus gastro intestinal (Steele and Morrison, 1969), l'haptocorrine qui lie la vitamine B12 empêchant ainsi son utilisation par les bactéries pour leur croissance (Gullberg, 1973) ou encore l' α -lactalbumine dont 3 peptides ont été identifiés comme ayant une activité microbicide (Pellegrini et al., 1999).

➤ **Les composants du système immunitaire maternel directement transférés au nouveau-né**

Comme énoncé précédemment, le système immunitaire du nouveau-né n'est pas totalement mature. Il nécessite un support maternel essentiel à son bon fonctionnement. Au cours de la période fœtale, des anticorps maternels de type IgG sont transférés via le placenta. Ces anticorps sont cruciaux pour la défense des tissus. Par la suite, le lait maternel va continuer à apporter ces anticorps ainsi que des IgM, mais va en majorité apporter des anticorps de type IgA essentiels à la défense des muqueuses (90%). Les IgA empêchent efficacement l'attachement des bactéries aux muqueuses et donc l'entrée des micro-organismes dans les tissus et, contrairement aux IgG, sont non-inflammatoires (Hanson, 1961). Le lait maternel est composé d'un taux élevé d'IgA qui sont dirigés contre tous les antigènes microbiens rencontrés par la mère, ce qui lui permet d'assurer une protection contre un large spectre de micro-organismes (Brandtzaeg, 2003; Hanson, 1998). La présence de ce type d'anticorps au niveau du lait maternel est due à la reconnaissance des antigènes microbiens au niveau de la muqueuse intestinale de la mère et plus précisément au niveau des cellules M des plaques de Peyer. Cette reconnaissance par les cellules M va induire une modification des lymphocytes B en sécréteurs d'IgA. Ces lymphocytes B vont ensuite quitter les plaques de Peyer et migrer vers les différents sites muqueux et les glandes exocrines. Les hormones lactogéniques vont diriger ces lymphocytes B producteurs d'IgA au niveau de la glande mammaire. Cette étape est appelée la migration entéro-mammaire. Les IgA vont ensuite se lier aux récepteurs aux Ig membranaires présents au niveau des cellules épithéliales glandulaires et vont être transférés dans le lait maternel. Ainsi, un nouveau-né allaité recevra entre 0,5 et 1g d'IgA par jour. Ce transfert passif d'immunoglobulines est la première ligne de défense du nouveau-né contre différentes bactéries pathogènes, certains virus et certaines candidoses (Lonnerdal, 2003).

La mère va également transmettre un certain nombre de ses cellules immunitaires via le lait maternel. En effet, on retrouve dans le lait maternel environ 10^9 leucocytes dont 60% de macrophages, 30% de neutrophiles et entre 5 et 10% de lymphocytes. Les macrophages expriment des marqueurs d'activation, ont une activité phagocytaire et sécrètent des facteurs immuno-régulateurs (Rivas et al., 1994). Ils contiennent également des IgA qu'ils peuvent relâcher au contact des bactéries commensales au niveau de l'intestin (Brandtzaeg, 2003). Les neutrophiles du lait maternel ont une adhérence, une motricité et une polarité diminuée et expriment des taux plus faibles de CD11b et de

L-sélectine, démontrant ainsi une activité limitée de ces neutrophiles chez le nouveau-né (Kim et al., 2003). Au niveau des lymphocytes du lait maternel, la grande majorité de ces lymphocytes sont des lymphocytes T. Les lymphocytes T CD8+ sont présents en plus grande quantité que dans le sang et ont une activité cytotoxique. On retrouve également des lymphocytes T CD4+ dans un état activé et exprimant le CD45RO, une protéine de surface associée à la mémoire immunitaire (Eglinton et al., 1994). Ces lymphocytes T d'origine maternelle pourraient à la fois compenser les défauts des lymphocytes T néonataux et accélérer leur maturation. En effet, les lymphocytes T du lait maternel peuvent traverser la barrière intestinale du nouveau-né et ainsi modifier les différentes proportions phénotypiques des lymphocytes T systémiques (Hawkes et al., 1999). De plus, l'impact de l'allaitement sur la taille du thymus met en évidence un rôle concret du lait maternel sur le développement des lymphocytes T notamment via le passage de l'IL-7 à travers la membrane épithéliale (Aspinall et al., 2011; Hasselbalch et al., 1999). Les lymphocytes T maternels peuvent également sécréter un certain nombre de cytokines permettant ainsi de pallier au défaut de différenciation des lymphocytes T néonataux.

➤ **Les molécules immuno-modulatrices présentes dans le lait maternel**

En plus de l'immunité maternelle transmise au nouveau-né de manière passive, le lait maternel est également composé de différents facteurs immuno-modulateurs avec de potentielles activités protectrices comme par exemple des cytokines et des facteurs de croissance. Ces molécules jouent un rôle majeur à la fois au niveau du contrôle et de la maturation du système immunitaire et de la muqueuse intestinale.

- **Les cytokines**

Le lait maternel contient un large spectre de cytokines pro ou anti-inflammatoires. La source primaire de ces cytokines est la glande mammaire mais les leucocytes présents dans le lait maternel peuvent également produire un certain nombre de cytokines. Même si l'on retrouve parfois des taux très élevés de ces cytokines, leurs taux varient généralement massivement en fonction des différents laits maternels ou du statut immunitaire de la mère allaitante. Parmi les cytokines anti-inflammatoires on peut noter l'IL-10, cytokine immunosuppressive, sécrétée par la glande mammaire mais également par les lymphocytes T présents dans le lait. L'IL-10 présent dans le lait maternel inhibe les réponses de type Th1 et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires. L'IL-10 va également interagir avec le TGF- β pour augmenter la synthèse d'IgA (Garofalo et al., 1995). Le TGF- β est également présent dans le lait maternel et va rapidement passer la muqueuse intestinale et rejoindre la plupart des tissus du nouveau-né, démontrant l'importance de cette cytokine dans le développement postnatal. Les nouveau-nés n'ayant pas de source de TGF- β maternel vont mourir très rapidement suite à une inflammation diffuse et létale, démontrant ainsi le rôle majeur du TGF- β maternel dans le développement général du nouveau-né mais également lui suggérant un rôle essentiel dans son immunité (Letterio et al., 1994). Le TGF- β est une cytokine immuno-régulatrice qui joue un rôle essentiel chez le nouveau-né notamment au niveau de l'induction de tolérance orale (Verhasselt et al., 2008) ou de la génération de lymphocytes B sécréteurs d'IgA (Bottcher et al., 2000). Le TGF- β est également une cytokine majeure dans la prévention des maladies allergiques (Oddy and Rosales, 2010). Enfin, le TGF- β pourrait également jouer un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité intestinale du nouveau-né (Donnet-Hughes et al., 2000).

Un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires sont également présentes en quantités variables dans le lait maternel, telles que l'IL1- β , l'IL-6, l'IL8 ou le TNF- α (Hawkes et al., 1999). Cependant la présence également dans le lait maternel du récepteur antagoniste de l'IL1 et des récepteurs solubles du TNF et de l'IL-6 permet de réduire leur activité pro-inflammatoire. Enfin, la présence prédominante et en quantité supérieure de l'IL-10 permet de supposer un rôle immuno-régulateur de cette cytokine sur les cytokines pro-inflammatoires (Filteau, 2001).

- Les hormones

En plus de leur rôle spécifique, les facteurs de croissance et les hormones peuvent également contrôler de manière plus générale la prolifération, la survie, la différenciation et la fonction des cellules du système immunitaire. Un large ensemble de ces composés est présent dans le lait maternel et ingéré par les nouveau-nés au cours de la maturation du système immunitaire en période néonatale. Parmi ces différentes hormones, la prolactine semble être un régulateur prometteur du développement immunitaire néonatal. La prolactine est classifiée comme hormone à activité immuno-régulatrice. Elle intervient via son récepteur le PRL-R, membre de la superfamille de l'IL-2, sur la maturation et la fonction des lymphocytes T, l'activation des macrophages et l'activité des cellules NK (Bernton et al., 1988; Reber, 1993). La prolactine stimule également la sécrétion d'anticorps et pourrait être utilisée comme adjuvant. La prolactine est présente en grande quantité dans le lait maternel à la fois chez l'animal (Kacsoh et al., 1993) et chez l'Homme (Ellis and Picciano, 1995) sous différentes isoformes en fonction du poids moléculaire et du degré de glycosylation ou de phosphorylation. Des études chez l'animal ont démontré que l'absorption d'un lait maternel déprivé en prolactine affectait la maturation des lymphocytes T dans le thymus, leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires et leur prolifération ainsi que la différenciation des lymphocytes B (Grove et al., 1991; Russell et al., 1988). La prolactine semble donc être un immuno-modulateur majeur du lait maternel. La leptine est également une hormone présente en grande quantité dans le lait maternel. Le lait maternel est la seule source de leptine en début de vie, le nouveau-né étant incapable d'en produire. Cette hormone joue un rôle essentiel sur la croissance du nouveau-né en période post-natale (Doneray et al., 2009; Pico et al., 2007) et prévient le développement de l'obésité (Palou and Pico, 2009). Beaucoup d'autres hormones sont présentes dans le lait maternel, telles que des corticostéroïdes, des hormones stéroïdiennes ou thyroïdiennes. Ces hormones ont des effets plus ou moins importants sur le développement général et immunitaire du nouveau-né (Hamosh, 2001)

- Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras poly insaturés (n-6) et (n-3) ont été mis en évidence comme modulateurs de la génération des lymphocytes Th1 et Th2 chez l'adulte (Calder and Grimble, 2002). Ces acides gras sont également présents dans le lait maternel et une autre étude a mis en évidence l'effet que pourraient avoir ces acides gras polyinsaturés sur le développement des réponses immunitaires chez le nouveau-né (Field et al., 2001). Ainsi, les acides gras polyinsaturés agissent directement sur la maturation, la prolifération et la fonction des lymphocytes T. Les acides gras (n-3) inhibent la prolifération des lymphocytes T, leur expression de CD25 et leur sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ (Calder et al., 2002). Cependant, les effets des acides gras polyinsaturés semblent être dépendants du type d'acide gras considéré, de la dose et de l'âge d'administration. Par exemple, la supplémentation en huile de poisson au cours des 4 premiers mois de lactation a été démontrée comme activateur de la sécrétion d'IFN- γ en réponse au LPS (Lauritzen et al., 2005). L'effet des acides gras insaturés sur la protection du

nouveau-né contre les infections reste cependant toujours controversée avec certaines études démontrant un impact positif (Pierre et al., 2007) et d'autres l'inverse (Anderson and Fritsche, 2002). Contrairement aux effets variables sur les infections, les acides gras polyinsaturés semblent avoir un impact bénéfique sur le développement des allergies. Un lait maternel faible en (n-3) acides gras est directement corrélé à un risque d'atopie élevé chez l'enfant (Duchen et al., 1998). De même un enrichissement de l'alimentation maternelle avec de l'huile de poisson riche en acides gras (n-3) permet de modifier la composition en composés immuno-actifs du lait maternel (Dunstan et al., 2004) et d'inhiber un certain nombre de marqueurs de risque atopique (D'Vaz et al., 2012; Dunstan et al., 2003).

➤ Impact du lait maternel sur la maturation intestinale

A la naissance, le tractus gastro-intestinal doit rapidement être efficace afin de digérer et d'absorber des nutriments pour maintenir un taux de croissance optimal du nouveau-né. L'intégrité de l'épithélium intestinal est de première importance puisqu'il est à la fois responsable de la sécrétion d'enzymes, de l'absorption des nutriments mais également de la barrière sélective contre les antigènes environnementaux en apport constant au niveau de la lumière intestinale (Artis, 2008). Cette constante exposition aux antigènes alimentaires et aux bactéries du microbiote intestinal est également nécessaire au développement des réponses immunitaires néonatales au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin (Neu, 2007). Pour ces raisons, la mise en place et le maintien d'une fonction adéquate du tractus gastro-intestinal jouent un rôle majeur dans le développement général du nouveau-né et la diminution de la mortalité infantile, les infections gastro-intestinales étant la première cause de mortalité chez les nouveau-nés.

Parmi les facteurs agissant sur le développement de l'épithélium digestif, la nutrition néonatale est un des composants critiques, à la fois de l'établissement de la fonction de digestion ainsi que de celui de la fonction de barrière et du système immunitaire muqueux (Ulluwishewa et al., 2011). L'adaptation à la nutrition entérale est un des premiers challenges du nouveau-né, après la période in utero au cours de laquelle la plupart des nutriments sont apportés via la circulation ombilicale et le liquide amniotique. L'adaptation à l'apport entéral des nutriments se fait classiquement au cours de la période néonatale notamment grâce au lait maternel qui apporte les nutriments essentiels à l'établissement de l'homéostasie du tractus gastro-intestinal.

A la naissance, la barrière intestinale est immature et adaptée à la digestion du lait maternel riche en acides gras et en lactose : les entérocytes sont spécialisés dans le métabolisme des acides gras et expriment de haut taux de lactase (Henning, 1981). Chez la souris, l'épithélium intestinal néonatal ne contient pas de cryptes. A la place, des cellules prolifératives sont retrouvées au niveau des poches inter-villositaires. Après une semaine, ces poches vont s'organiser en cryptes qui vont progressivement augmenter en taille et en nombre au cours des 2 dernières semaines de la période post-natale. Les cellules de Paneth, spécialisées dans la sécrétion de protéines antimicrobiennes telles que l' α -defensine ou le lysozyme, apparaissent également au moment de la formation des cryptes (de Santa Barbara et al., 2003). L'épithélium intestinal va ensuite subir une nouvelle différenciation structurale et biochimique lors du sevrage afin de s'adapter à la nourriture solide qui contient en majorité des carbohydrates. Ainsi, l'expression de la lactase va diminuer afin d'être remplacée par la sucrase isomaltase, responsable de la digestion des carbohydrates complexes présents dans l'alimentation solide (Krasinski et al., 1994). Enfin, la maturation intestinale se traduit également par une diminution

de la perméabilité aux antigènes. Ainsi, il a été mis en évidence à la fois dans des modèles animaux (Heyman et al., 1986; Udall et al., 1981b) et chez l'Homme (Weaver et al., 1984) que la barrière intestinale du nouveau-né est beaucoup plus perméable aux macromolécules que celle de l'adulte et donc potentiellement plus sensible à l'entrée d'antigènes délétères. En plus des composés nutritionnels qui peuvent accélérer la maturation intestinale, l'intestin du nouveau-né subit un processus de maturation progressive génétiquement contrôlée via l'expression du facteur de transcription Blimp (Harper et al., 2011; Muncan et al., 2011).

Le lait maternel apporte de nombreuses molécules essentielles au développement de la muqueuse intestinale. Parmi ces molécules, les nutriments sont des acteurs majeurs notamment, d'une part, les acides aminés dont les propriétés physico-chimiques, la concentration et la génération de peptides bioactifs affectent les fonctions mécaniques, hormonales et neuroendocrines du tractus gastro-intestinal (Marc Rhoads and Wu, 2009) et d'autre part, les acides gras et leurs métabolites qui sont des sources majeures d'énergie, d'importants composants des membranes cellulaires, des substrats métaboliques dans de nombreuses voies de signalisation biochimiques, des molécules de signalisation cellulaire et jouent un rôle majeur d'immuno-modulateurs (Odle, 1997). En plus de ces nutriments essentiels apportés par le lait maternel, la présence de facteurs de croissance, d'hormones et de cytokines jouent également un rôle majeur sur cette maturation (Blum and Baumrucker, 2008). Parmi ces molécules, il est important de noter le rôle important de l'EGF (epidermal growth factor) sur la maturation de la muqueuse intestinale. Ce facteur de croissance est connu pour activer la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mais joue également un rôle essentiel dans la réparation de la muqueuse intestinale. Chez le nouveau-né, il a été démontré le rôle essentiel de l'EGF sur le développement et la maturation de la muqueuse intestinale, se traduisant par une augmentation du poids plus rapide des nouveau-nés ayant reçu de l'EGF, un intestin plus long et plus prolifératif (Berse, 1987). L'impact majeur de l'EGF présent dans le lait maternel sur la maturation intestinale a ensuite largement été confirmé notamment chez l'Homme, mettant ainsi en avant son rôle possiblement protecteur contre le développement d'entérocolites nécrosantes (Dvorak, 2010). La famille de l'IGF (insulin growth factor) joue également un rôle important sur la maturation de la muqueuse intestinale. Ainsi, l'administration d'IGF augmente l'épaisseur de la barrière muqueuse et musculaire de l'intestin, promeut la croissance longitudinale de l'intestin et augmente l'absorption du sodium et du glucose (Alexander and Carey, 1999). De plus, l'administration d'IGF augmente la croissance des villosités et l'expression de la lactase, enzyme essentielle à la dégradation du lactose présent dans le lait maternel (Houle et al., 2000). Enfin, d'autres molécules semblent jouer un rôle un peu moins important mais non négligeable sur le développement de la muqueuse intestinale telles que la lactoferrine, le TGF- β , la leptine ou encore les stéroïdes (Blum and Baumrucker, 2008). Enfin, il apparaît que des composés présents dans le lait maternel peuvent avoir un rôle également sur la diminution de la perméabilité intestinale qui a lieu au cours de la période post-natale. Ainsi, il a été démontré dans un modèle animal que l'allaitement promouvait la maturation de l'intestin via une diminution de sa perméabilité (Udall et al., 1981a). En comparaison, les nouveau-nés qui reçoivent une formule de lait synthétique ont un délai dans l'établissement de cette fonction (Le Huerou-Luron et al., 2010). Cependant, des études restent nécessaires afin de mettre en évidence quelles molécules précisément jouent un rôle dans cette étape.

En conclusion, le lait maternel joue un rôle majeur à la fois sur le développement et le fonctionnement de la muqueuse intestinale.

II) La tolérance orale

La tolérance est un mécanisme immuno-régulateur essentiel qui inhibe les réponses immunitaires inappropriées de l'organisme. On distingue, d'une part, la tolérance centrale qui a lieu au niveau du thymus et qui consiste à éliminer les lymphocytes T auto-réactifs générés au niveau du thymus et qui reconnaissent le soi. D'autre part, la tolérance périphérique inhibe le développement de réponses inflammatoires suite à l'administration d'un antigène dans des conditions qui stimulent l'activation du système immunitaire. Il existe différents mécanismes d'induction de tolérance immunitaire :

- l'apoptose des lymphocytes T effecteurs activés de manière persistante ou dont la présence n'est plus nécessaire, permet notamment l'acceptation de tissus greffés provenant d'un donneur.
- l'anergie des lymphocytes T effecteurs a lieu en absence d'un signal de costimulation après la reconnaissance du complexe CMH II/antigène par le TCR du lymphocyte T : les lymphocytes T ne répondent pas au signal, ne prolifèrent pas et ne sécrètent pas de cytokines et conservent cette anergie lors des contacts ultérieurs avec l'antigène. Le CD28 et le CD40L sont les principaux ligands de costimulation exprimés par les lymphocytes T activés. Des études utilisant la délétion de ces molécules de costimulation a permis de mettre en évidence la possibilité d'induire de la tolérance par ce biais dans des modèles d'allogreffes mais également dans un modèle de diabète auto-immun.
- l'induction de lymphocytes T régulateurs est un des mécanismes majeurs de l'induction de tolérance (voir chapitre sur les lymphocytes T régulateurs). Ces lymphocytes T régulateurs permettent via leur contact, leur sécrétion de cytokines ou leur expression de molécules immuno-régulatrices d'inhiber activement les réponses immunitaires inappropriées de l'organisme.

La tolérance orale est un processus de tolérance périphérique, consistant en une immunosuppression suite à l'administration d'un antigène par voie orale. Il s'agit d'un processus physiologique qui peut également être utilisé comme un outil immunologique.

1) La tolérance orale chez l'adulte

a) Généralités

La muqueuse intestinale est la surface principale de contact avec les antigènes environnementaux. En effet, la surface de la muqueuse de l'intestin grêle est estimée à 300m² chez l'Homme (Faria and Weiner, 2005; Weiner et al., 2011). En plus de son rôle majeur de barrière, la muqueuse intestinale joue aussi un rôle fondamental d'absorption et d'immunité. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale est le plus étendu de l'organisme et possède le rôle essentiel de faire la distinction entre les antigènes inoffensifs et les antigènes nuisibles afin d'induire la réponse immunitaire la mieux adaptée. La muqueuse intestinale est en constante exposition avec des antigènes alimentaires d'une part (environ 30 kg de nourriture par an dont environ 150g de protéines sont absorbées dans l'intestin

chaque jour) et des antigènes microbiens commensaux d'autre part (10^{12} micro-organismes par gramme de contenu intestinal au niveau du colon). La réponse immunitaire induite par défaut suite à l'exposition aux antigènes alimentaires et aux bactéries commensales au niveau de la muqueuse intestinale est la tolérance orale : une réponse immunitaire active et suppressive qui se traduit par une régulation des réponses inflammatoires délétères et une absence de symptômes cliniques en réponse à l'exposition aux antigènes inoffensifs. Lorsque la tolérance orale n'est pas mise en place contre les bactéries commensales, les réactions inflammatoires à l'encontre de ces bactéries inoffensives donnent lieu à des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse. L'incidence de ces maladies est actuellement en constante augmentation et peut toucher jusqu'à 0,6% de la population dans certains pays développés (Molodecky et al., 2012). L'absence de tolérance orale à l'encontre d'un antigène alimentaire peut résulter en allergies alimentaires ou en maladie cœliaque (intolérance au gluten). Il est important de distinguer la tolérance orale induite à l'encontre du microbiote intestinal et des antigènes alimentaires. Dans le cas du microbiote, la tolérance orale est uniquement locale alors que dans le cas d'un antigène alimentaire, la tolérance induite via la muqueuse intestinale par l'antigène donné oralement va induire une tolérance locale mais également systémique. Dans ma thèse, je me concentrerai essentiellement sur la tolérance orale induite par l'administration d'un antigène par voie orale. La tolérance orale a été bien étudiée au cours du siècle dernier et est devenue un outil immunologique majeur d'induction de tolérance systémique. En effet, la réponse régulatrice induite par l'administration d'un antigène par voie orale permet d'induire une protection contre l'administration ultérieure, même à distance, de cet antigène. Elle a été mise en évidence à la fois chez la souris et chez l'Homme suite à l'administration de différents antigènes tels que des protéines ou des haptènes. Les effets régulateurs de la tolérance orale peuvent être mesurés par la réduction de l'hypersensibilité systémique, de la prolifération des lymphocytes T et de la sécrétion de cytokines. La sécrétion d'anticorps peut également être inhibée particulièrement les IgE et les IgG2a. La tolérance orale semble donc atténuer un grand nombre de réponses immunitaires y compris à distance du site d'induction et jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Pour ces raisons, la tolérance orale semble être une voie envisageable de protection efficace contre le développement de maladies auto-immunes ou de maladies pro-inflammatoires (Pabst and Mowat, 2012).

b) Mécanismes

➤ **Lieu d'induction**

Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale est classiquement subdivisé en deux parties : les sites effecteurs et les sites inducteurs. Les sites effecteurs consistent en un réseau peu organisé de lymphocytes T activés et de plasmocytes sécrétant d'anticorps dispersés au niveau de l'épithélium intestinal et de la lamina propria de la muqueuse intestinale. Les sites inducteurs quant à eux regroupent les tissus lymphoïdes organisés de la muqueuse intestinale et sont responsables de l'initiation de la réponse immunitaire. Ceux-ci comprennent les plaques de Peyer et les ganglions drainant l'intestin, les ganglions mésentériques (MLN) (Mowat, 2003) (voir Figure 9).

- Les plaques de Peyer

Les plaques de Peyer sont des agrégats lymphoïdes macroscopiques au niveau de la couche sous-muqueuse de l'intestin. Elles consistent en large follicules de lymphocytes B subdivisés par des zones spécifiques de lymphocytes T. Les zones lymphoïdes sont séparées de la lumière intestinale par une fine couche de cellules épithéliales contenant un faible niveau d'enzymes digestives et infiltrée par un grand nombre de cellules immunitaires de tout type, l'épithélium associé au follicule (FAE) et une zone plus diffuse directement en-dessous de la FAE, le dôme sub-épithélial (SED). Les plaques de Peyer contiennent également des cellules M (microfold) qui consistent en des entérocytes différenciés capables de lier des antigènes particuliers dont des bactéries telles que *Salmonella*, *Shigella* ou *Yersinia*. Les cellules M ont longtemps été considérées comme le lieu de capture majeur des antigènes afin d'activer le système immunitaire digestif. Pourtant leur manque d'expression du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de type II) n'en font pas des cellules capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T. Ces cellules seraient donc plutôt responsables du passage de l'antigène à des cellules présentatrices d'antigène compétentes. Par contre, les cellules M semblent jouer un rôle majeur dans la tolérance aux bactéries intestinales. En effet, elles expriment des caractéristiques structurales et moléculaires dont notamment l'expression à leur surface de divers récepteurs aux antigènes microbiens (récepteurs toll-like, adhésine, intégrine $\alpha 5\beta 1$, glycoprotéine 2...) essentielles à la transcytose des bactéries et donc à l'initiation de l'immunité à l'encontre des antigènes bactériens (Hase et al., 2009). Les plaques de Peyer ont cependant été démontrées comme accessoires dans l'initiation de la tolérance orale aux antigènes alimentaires. En effet, la tolérance orale, à l'encontre par exemple de l'ovalbumine (OVA), se met en place efficacement dans des souches de souris génétiquement modifiées pour ne pas avoir de plaques de Peyer ou des plaques de Peyer inefficaces (TNF- KO, LT β KO ou LT α -LT β hétérozygotes) (Spahn et al., 2001; Spahn et al., 2002). Les plaques de Peyer semblent donc être de plus en plus restreintes à un rôle d'assistance de l'initiation de la réponse immunitaire sans pour autant y être essentielle. D'autres études tendent également à démontrer que certains antigènes donnés oralement se retrouveraient directement dans la lamina propria où ils seraient captés par des cellules présentatrices d'antigène in situ (Chirido et al., 2005).

- Les ganglions mésentériques

Les ganglions mésentériques sont les ganglions lymphatiques les plus larges de l'organisme. En contraste du rôle controversé des plaques de Peyer, il ne semble subsister aucun doute quant à l'importance des ganglions mésentériques dans l'initiation de la tolérance orale. Dans les études utilisant la délétion à la fois des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques, la tolérance orale ne peut être induite mais peut être restaurée par le développement sélectif des ganglions mésentériques. De même, la résection chirurgicale des MLN empêche l'induction de tolérance orale (Worbs et al., 2006). Afin de déterminer le lieu exact de reconnaissance de l'antigène et d'activation des lymphocytes T, certains auteurs ont utilisé une molécule capable d'empêcher la recirculation des lymphocytes, le FTY720 (Worbs et al., 2006). Cette molécule immuno-modulatrice a été démontrée comme interférant avec le récepteur de la sphingosine-1-phosphate essentiel à la migration des lymphocytes des organes lymphoïdes aux canaux efférents lymphatiques (Matloubian et al., 2004). L'utilisation de cette molécule a permis de mettre en évidence les ganglions mésentériques comme le lieu initial de capture de l'antigène et d'activation des lymphocytes T à l'origine de l'induction de la

tolérance orale (Worbs et al., 2006). En conclusion, même si le rôle des plaques de Peyer a souvent été débattu, le ganglion mésentérique semble bien être le lieu privilégié d'induction de tolérance orale.

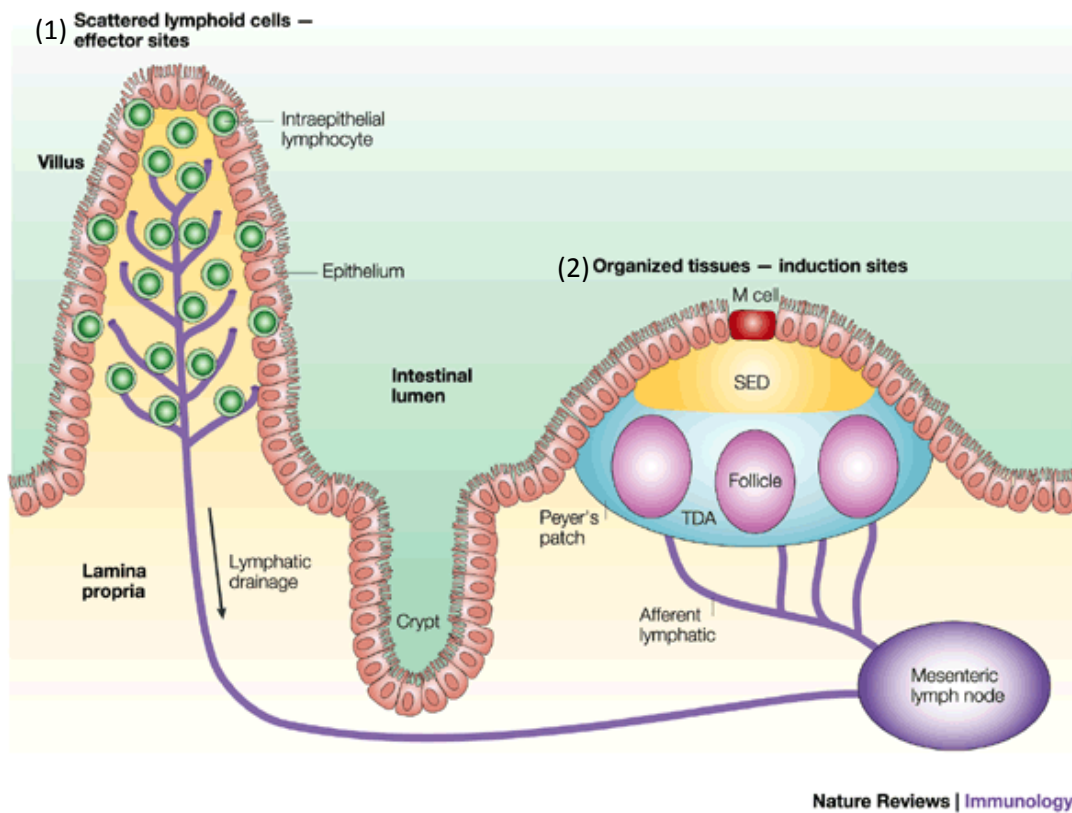


Figure 9: Le tissu lymphoïde associé à l'intestin

D'après "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens", Mowat, Nature reviews immunology, 2003

Le tissu lymphoïde associé à l'intestin est divisé en sites effecteurs (1) et en sites d'induction ou tissus organisés (2). Les sites effecteurs consistent en lymphocytes Intra-épithéliaux disséminés sous la surface de l'épithélium et les sites d'induction sont les plaques de Peyer (Peyer's patches) et les ganglions mésentériques (mesenteric lymph nodes)

➤ Les étapes clés de la tolérance orale

Quatre étapes clés surviennent au cours de l'induction de tolérance orale. Premièrement, le passage de l'antigène au niveau de la muqueuse intestinale permet sa capture par des cellules dendritiques particulières qui induiront dans un troisième temps l'induction de lymphocytes T régulateurs au niveau des ganglions mésentériques. Pour finir, ces lymphocytes T régulateurs vont quitter les ganglions mésentériques et rejoindre la muqueuse intestinale où ils vont assurer la mise en place d'un environnement pro-tolérologène qui prévient l'hypersensibilité au niveau de la muqueuse elle-même. Au vu de l'impact systémique de la tolérance orale, ces lymphocytes T régulateurs pourraient également quitter le tissu intestinal et rejoindre la circulation lymphatique et sanguine afin d'une part d'inhiber les réponses T effectrices et d'induire des réponses T régulatrices par un mécanisme dit de tolérance infectieuse (Pabst and Mowat, 2012). Contrairement aux premières étapes de l'induction de tolérance orale (capture et présentation de l'antigène et induction de lymphocytes T régulateurs), cette dernière étape nécessite encore à ce jour une étude plus approfondie.

- **Le passage de la barrière intestinale**

La première étape essentielle de l'induction de tolérance orale est le passage de l'antigène à travers la barrière intestinale. Après l'administration par voie orale d'un antigène alimentaire, cet antigène doit passer de la lumière intestinale à la muqueuse intestinale afin d'y être capturé pour induire de la tolérance (voir Figure 10).

Il a tout d'abord été avancé l'importance des plaques de Peyer et plus particulièrement des cellules M dans la capture et le passage de l'antigène de la lumière intestinale au tissu lymphoïde associé à l'intestin. Cependant, comme énoncé précédemment, la tolérance orale peut avoir lieu de manière efficace en absence de plaques de Peyer, démontrant un rôle accessoire des cellules M dans l'induction de tolérance orale à l'encontre des antigènes alimentaires. Il semble actuellement de plus en plus évident que l'étape cruciale de l'induction de tolérance orale est la capture de l'antigène par les cellules dendritiques de la lamina propria soulignant les villosités intestinales (Pabst and Mowat, 2012). Malgré le pH très acide de l'estomac et les enzymes protéolytiques qui dégradent les nutriments au niveau du tractus gastro-intestinal supérieur, certains antigènes alimentaires sont résistants à la dégradation et les composés immunogéniques peuvent atteindre la lumière intestinale. Par exemple, la β -lactoglobuline est stable en milieu acide et résistante à la digestion par la pepsine. La gliadine, présente dans le gluten, est également résistante à la digestion enzymatique au sein de la lumière intestinale grâce à son haut taux de proline (20%) (Shan et al., 2002). Ainsi, lorsqu'un antigène est administré par voie orale, on peut observer cet antigène quelques minutes plus tard au niveau de l'épithélium digestif et en utilisant un antigène marqué, on peut le mettre en évidence au niveau des cellules dendritiques CD11c+ de la lamina propria 30 à 60 minutes après l'administration de l'antigène (Chirido et al., 2005). Il apparaît donc important de comprendre comment ces cellules dendritiques ont pu avoir accès à l'antigène présent dans la lumière intestinale malgré son rôle majeur de barrière protectrice.

- *Le transport direct via les entérocytes*

Les molécules de petit poids moléculaire (moins de 600 Da) peuvent traverser directement la barrière intestinale grâce à un mécanisme de diffusion para-cellulaire au niveau des pores présents dans les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Les molécules de plus haut poids moléculaire utilisent un transport trans-cellulaire impliquant l'endo et l'exocytose médiée ou non par des récepteurs membranaires (Menard et al., 2010). Le transport trans-cellulaire a été mis en évidence dans les années 70 chez le rat puis confirmée dans les années 80 dans d'autres modèles animaux puis chez l'Homme grâce à l'étude de la perméabilité intestinale d'une enzyme particulière la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase, HRP) (Heyman et al., 1982; Heyman et al., 1988; Warshaw et al., 1971). Des études complémentaires ont mis en évidence qu'une très faible quantité de protéines alimentaires sont transcytosées directement (environ 10% des protéines arrivent dans leur forme intacte). La plus grande partie des protéines sont dégradées et libérées au niveau du pôle basal des cellules épithéliales sous forme de grands peptides (40%) ou d'acides aminés (50%) (Heyman et al., 1982). C'est ensuite à ce niveau-là que les protéines et les peptides vont être captés par les cellules dendritiques puis dégradés en peptides immunogéniques afin d'être présentés via le CMH.

- *Le transport via les exosomes*

Les exosomes sont de petites vésicules (environ 80nm de diamètre) décrits pour la première fois dans les réticulocytes (Harding et al., 1984). Durant leur maturation, les réticulocytes perdent leur récepteur

à la transferrine. Ce processus se déroule en deux étapes : premièrement le récepteur est intégré dans de petites vésicules absorbées dans les endosomes puis les endosomes fusionnent à la surface membranaire de la cellule pour libérer ces petites vésicules dans la lumière extracellulaire. C'est au moment de cette libération extracellulaire que ces vésicules sont appelées exosomes (Fevrier and Raposo, 2004). Les exosomes ont ensuite été mis en évidence dans les lymphocytes B puis dans les cellules dendritiques : les cellules présentatrices d'antigène sont capables de dégrader des protéines et de relâcher des exosomes présentant à leur surface le peptide antigénique directement lié au CMH II (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998). Dans ce contexte, les exosomes peuvent être dirigés vers le lysosome ou fusionner avec la membrane cellulaire afin d'être relâchés dans le compartiment extracellulaire. Il a enfin été mis en évidence la capacité des cellules épithéliales intestinales à également générer des exosomes (van Niel et al., 2001). De manière comparable aux cellules présentatrices d'antigène, les cellules épithéliales intestinales sont capables de relâcher au niveau de la lamina propria des exosomes porteurs du CMH II et du peptide antigénique sous une forme très immunogénique. Des études *in vitro* ont mis en évidence que ces exosomes étaient capables d'interagir de manière très efficace avec les cellules dendritiques et d'induire une activation des lymphocytes T spécifique de l'antigène à des doses 100 fois plus faibles que le peptide libre (Van Niel et al., 2003). L'administration systémique *in vivo* d'exosomes induit quant à elle une réponse immunitaire très marquée. La capacité des exosomes à induire de la tolérance au niveau intestinal dépendrait donc plus spécifiquement des cellules dendritiques qui captent ces vésicules au niveau de la lamina propria et des facteurs épithéliaux conditionnant leur phénotype. Ainsi des études ont mis en évidence la notion de tolérosomes générés au niveau de la muqueuse intestinale en réponse à des antigènes donnés oralement et capables d'induire de la tolérance orale lorsqu'ils sont transmis à des animaux naïfs (Karlsson et al., 2001). Il reste encore aujourd'hui à démontrer le lien direct entre ces tolérosomes et les cellules dendritiques spécialisées dans l'induction de tolérance orale.

- *Le transport sous forme de complexes immuns*

Les antigènes peuvent également accéder à la muqueuse intestinale grâce à l'expression de récepteurs aux immunoglobulines présents au niveau de la membrane apicale des entérocytes, sous forme de complexes immuns. On distingue trois classes d'anticorps capables de se lier aux antigènes au niveau intestinal : les IgA, les IgE et les IgG.

- Les IgA sont les anticorps les plus représentés au niveau de la muqueuse intestinale. Un récepteur aux IgA est présent à la surface des entérocytes pour assurer la sortie des IgA vers la lumière intestinale afin d'assurer la protection de la muqueuse mais des cas de transport inverse ont également été démontrés avec un rôle plus ou moins bénéfique sur la muqueuse intestinale notamment dans le cas d'une infection à *Shigella flexneri* où le passage par ce récepteur induit à la fois une protection et un maintien de l'intégrité épithéliale (Boullier et al., 2009; Kadaoui and Cortes, 2007). Même si dans le cas des antigènes bactériens ce passage de complexes immuns de la lumière intestinale à la muqueuse semble être bénéfique, il devient délétère lorsqu'il s'agit d'un antigène alimentaire. C'est notamment le cas dans la maladie cœliaque dans laquelle le passage de la gliadine complexée aux IgA par le récepteur aux IgA active de manière anormale les lymphocytes T brisant ainsi la tolérance à cet antigène alimentaire normalement inoffensif (Matysiak-Budnik et al., 2008).
- Le transport des complexes immuns impliquant les IgE est surtout impliqué dans la génération de l'allergie alimentaire via le récepteur CD23. Chez des rats immunisés à HRP, le transport

trans-cellulaire de la protéine est plus rapide au niveau des cellules épithéliales intestinales que chez un rat naïf et ce transport actif a été mis en évidence comme dépendant du récepteur CD23 aux IgE (Berin et al., 1997; Yang et al., 2000). Ce passage sous forme de complexe immunitaire protège l'antigène contre la dégradation par les lysosomes résultant en une plus grande quantité d'allergène présente au niveau de la muqueuse (Bevilacqua et al., 2004).

- La présence des IgG au niveau de la muqueuse intestinale est la deuxième plus importante après les IgA. Le transport de ces anticorps se fait via un récepteur particulier le Fc récepteur néonatal. Ce récepteur a été mis en évidence lors de l'allaitement chez les rats qui recevaient de manière passive l'immunité de leur mère via l'absorption intestinale des IgG présents dans le lait maternel (Brambell, 1966; Jones and Waldmann, 1971). Le FcRn se retrouve uniquement chez le nouveau-né chez les rongeurs mais est conservé à l'âge adulte chez l'Homme (Israel et al., 1997). Il semble essentiel pour le passage des complexes immunitaires IgG/antigène au travers de la barrière intestinale et pour la présentation de ces antigènes aux cellules dendritiques au niveau de la lamina propria. Des souris transgéniques exprimant le FcRn humain ont mis en évidence un transport protégé de l'antigène via ce mécanisme et une présentation efficace via les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD4+. (Yoshida et al., 2004). La présentation des complexes immunitaires IgG/antigène par les cellules dendritiques a d'ailleurs été démontrée comme inductrice d'une immunosuppression (Caulfield and Shaffer, 1987). Enfin, chez le nouveau-né souris, le passage de complexes immunitaires IgG antigène présents dans le lait maternel par ce récepteur FcRn permet d'induire de la tolérance orale à l'encontre de cet antigène via la génération de lymphocytes T régulateurs (Mosconi et al., 2010).

Ainsi, le passage de l'antigène sous forme de complexe immunitaire permet un passage actif et de manière non dégradée. Même si dans le cas des IgA associés aux antigènes bactériens la tolérance orale au microbiote est efficace, l'association des IgA est le plus souvent délétère quand il s'agit d'IgA associés aux antigènes alimentaires ou d'IgE. Le passage sous forme de complexes immunitaires avec des IgG quant à lui semble jouer un rôle important dans l'immunité intestinale mais également dans l'induction de tolérance orale notamment chez le nouveau-né.

- *Le rôle des cellules myéloïdes CX3CR1+*

Une population de cellules myéloïdes présentes au niveau de la lamina propria et qui expriment le CX3CR1 a également été mise en évidence comme une population importante dans l'induction de tolérance orale. Ces cellules sont capables d'accéder à la lumière intestinale via des expansions cellulaires (dendrites) traversant la barrière intestinale et donc de capter directement les antigènes (Niess et al., 2005) sans perturber l'intégrité intestinale. Cependant ces dendrites sont exprimées de manière très variable en fonction des souches de souris et de la section d'intestin étudiée et semblent dépendre de stimuli particuliers, remettant ainsi en cause l'importance de ce type de cellules (Chieppa et al., 2006). Enfin, ces cellules CX3CR1+ ne semblent pas être de bonnes cellules présentatrices d'antigène pour l'induction de tolérance orale puisqu'elles sont incapables de migrer vers les ganglions mésentériques, site majeur d'induction de tolérance orale, et d'y activer des lymphocytes T naïfs (Schulz et al., 2009). Or, le rôle majeur du transport de l'antigène vers les MLN et de la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques a été mis en évidence dans l'induction de tolérance au niveau intestinal (Worbs et al., 2006). Ces cellules CX3CR1+ sembleraient donc plutôt jouer un rôle accessoire de capture de l'antigène et de passage de cet antigène à des cellules dendritiques migratoires et efficaces pour l'induction de réponses T régulatrices : les cellules dendritiques CD103+. Les cellules

myéloïdes CX3CR1 jouent également un rôle essentiel dans le maintien des lymphocytes T régulateurs induits au niveau des MLN et qui rejoignent la lamina propria. Cette étape sera décrite plus en détails plus bas.

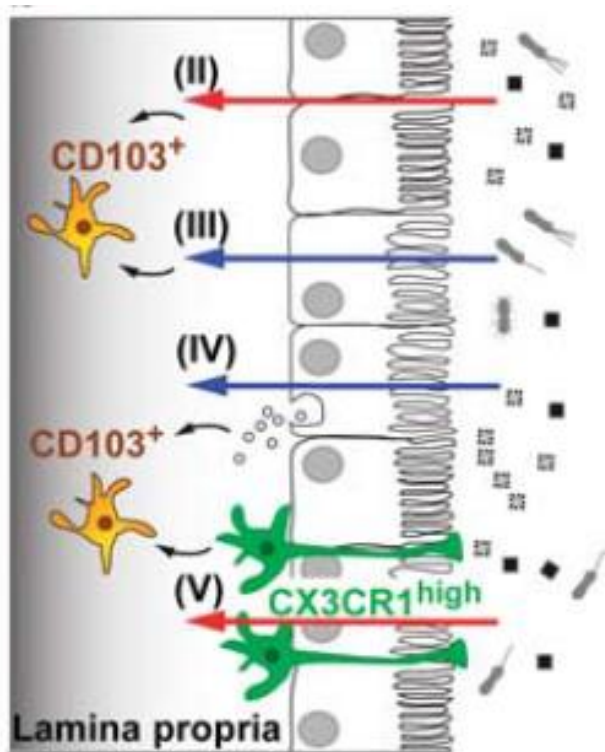


Figure 10: Transport de l'antigène via la barrière intestinale

D'après: « Oral tolerance to food protein » Pabst and Mowat, *Mucosal immunology*, 2012

Les cellules dendritiques CD103+ présentes dans la lamina propria peuvent capter directement l'antigène après son passage à travers la muqueuse intestinale à travers les jonctions serrées de l'épithélium intestinal (II) ou par voie transcellulaire (III). Des exosomes contenant l'antigène complexé au MHCII des entérocytes peuvent également être captés par les cellules dendritiques (IV). Enfin, les macrophages et cellules dendritiques CX3CR1+ peuvent étendre leurs dendrites afin de traverser la couche de cellules épithéliales pour capter l'antigène (V) et le transférer aux cellules dendritiques CD103+, qui sont les cellules les plus compétentes à l'induction de tolérance. Ces cellules dendritiques CD103+ vont ensuite migrer dans les ganglions mésentériques.

- La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques CD103+ au niveau des ganglions mésentériques

Une des avancées principales de la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance orale a été l'identification d'une sous-population de cellules dendritiques intestinales exprimant à leur surface le CD103 (αE intégrine) et sécrétant de l'acide rétinoïque.

Le rôle important des cellules dendritiques a tout d'abord été suggérée par une étude démontrant que l'expansion des cellules dendritiques *in vivo* permettait d'améliorer l'induction de tolérance orale. En effet, l'administration d'un facteur de croissance de cellules dendritiques *in vivo*, le Flt3L, permet d'induire une tolérance orale plus efficace et à des doses normalement inopérantes chez la souris (Viney et al., 1998). Il fut ensuite démontré que les cellules dendritiques présentes au niveau des ganglions mésentériques étaient capables de produire du TGF- β après une administration d'OVA par voie orale (Akbari et al., 2001). Cette sécrétion de TGF- β par les cellules dendritiques pourrait contribuer à la création d'un milieu pro-tolérologène au niveau de la muqueuse intestinale (Weiner, 2001b). Enfin, le rôle essentiel des cellules dendritiques au niveau des ganglions mésentériques a été

confirmé par une étude démontrant que la migration des cellules dendritiques de la muqueuse intestinale aux MLN était une étape nécessaire à l'induction de la tolérance orale (Worbs et al., 2006).

Au niveau de l'intestin, la génération des lymphocytes T régulateurs, acteurs principaux de la tolérance orale, nécessite la présence de TGF- β mais un cofacteur semble également être essentiel à cette induction : l'acide rétinoïque. Il a tout d'abord été démontré que les cellules dendritiques, et plus particulièrement les cellules dendritiques CD103+, avaient besoin de cette molécule pour induire l'expression à la surface des lymphocytes T et B de molécules de recrutement à la muqueuse intestinale telles que $\alpha 4\beta 7$ ou CCR9 (Iwata et al., 2004; Johansson-Lindbom et al., 2005; Mora et al., 2006). L'acide rétinoïque, sécrété par les cellules dendritiques CD103+, a ensuite été mis en évidence comme cofacteur essentiel du TGF- β dans la différenciation des lymphocytes T régulateurs au niveau de la muqueuse intestinale à la fois chez la souris (Benson et al., 2007; Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2007; Sun et al., 2007) et chez l'Homme (Iliev et al., 2009b). La capacité des cellules dendritiques CD103+ à sécréter de l'acide rétinoïque est due à la présence sur ces cellules d'une enzyme particulière, la RALDH (rétinaldéhyde déshydrogénase), qui permet la conversion des métabolites de la vitamine A (rétinol et rétinal) en acide rétinoïque (voir Figure 11). Des facteurs présents au niveau de l'intestin sont également capables de contribuer à la production d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques CD103+ tels que les ligands du TLR2 (Wang et al., 2011), le GM-CSF ou l'IL-4 (Yokota et al., 2009). En plus de leur capacité à générer de l'acide rétinoïque, les cellules dendritiques CD103+ ont également la capacité d'activer le TGF- β latent grâce à leur expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 8$ (Travis et al., 2007), ce qui semble également être important pour leur capacité à générer des lymphocytes T régulateurs (Paidassi et al., 2011). Enfin, les cellules dendritiques CD103+ expriment également l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui joue un rôle important dans la génération des lymphocytes T régulateurs Foxp3 et l'induction de tolérance orale (Matteoli et al., 2010).

L'expression de la molécule CD103 en elle-même semble également jouer un rôle dans la capacité à induire des réponses régulatrices (Annacker et al., 2005). Cependant, l'expression du CD103 n'est pas obligatoirement liée à un phénotype pro-toléro-gène puisque les cellules dendritiques CD103+ sont immunogènes au niveau de la peau, de la muqueuse orale ou des poumons (Ballesteros-Tato et al., 2010; Bedoui et al., 2009; Nudel et al., 2011). Au niveau de ces tissus, des cellules dendritiques CD103- sont capables de sécréter de l'acide rétinoïque et de générer des lymphocytes T régulateurs (Guilliams et al., 2010). Ainsi, la molécule CD103 ne semble pas être un marqueur « universel » des cellules dendritiques sécrétrices d'acide rétinoïque mais plutôt un marqueur acquis au niveau du tissu intestinal. En effet, l'incubation de cellules précurseurs de cellules dendritiques provenant de la moelle osseuse avec des surnageants dérivés de cellules épithéliales intestinales suffit à induire l'expression du CD103 et de la RALDH et la capacité à induire des lymphocytes T régulateurs (Iliev et al., 2009a; Iliev et al., 2009b). Parmi les facteurs sécrétés par les cellules épithéliales intestinales, le TGF- β et l'acide rétinoïque semblent être les deux facteurs majeurs de la différenciation des cellules dendritiques CD103+ (chez l'Homme, le TSLP joue également un rôle). L'acide rétinoïque joue donc également un rôle dans la génération des cellules CD103+ RALDH+ au niveau de la muqueuse intestinale. Ainsi, les cellules dendritiques isolées des intestins de souris nourries avec un régime déficient en rétinoïdes ont des taux plus bas d'expression de la RALDH. Un apport en acide rétinoïque va directement induire la génération d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques intestinales (Molenaar et al., 2011). La source majeure d'acide rétinoïque au niveau de l'intestin est l'acide rétinoïque converti au niveau des cellules intestinales à partir des rétinoïdes provenant de l'alimentation mais également à partir de la bile (Jansson-Gyllenback et al., 2011). La coopération des cellules dendritiques avec les cellules

stromales du ganglion mésentérique semble également être un facteur non négligeable de l'activité des cellules dendritiques CD103+ grâce à leur expression de la RALDH, beaucoup plus élevée que dans les cellules stromales des ganglions périphériques (Hammerschmidt et al., 2008; Molenaar et al., 2009).

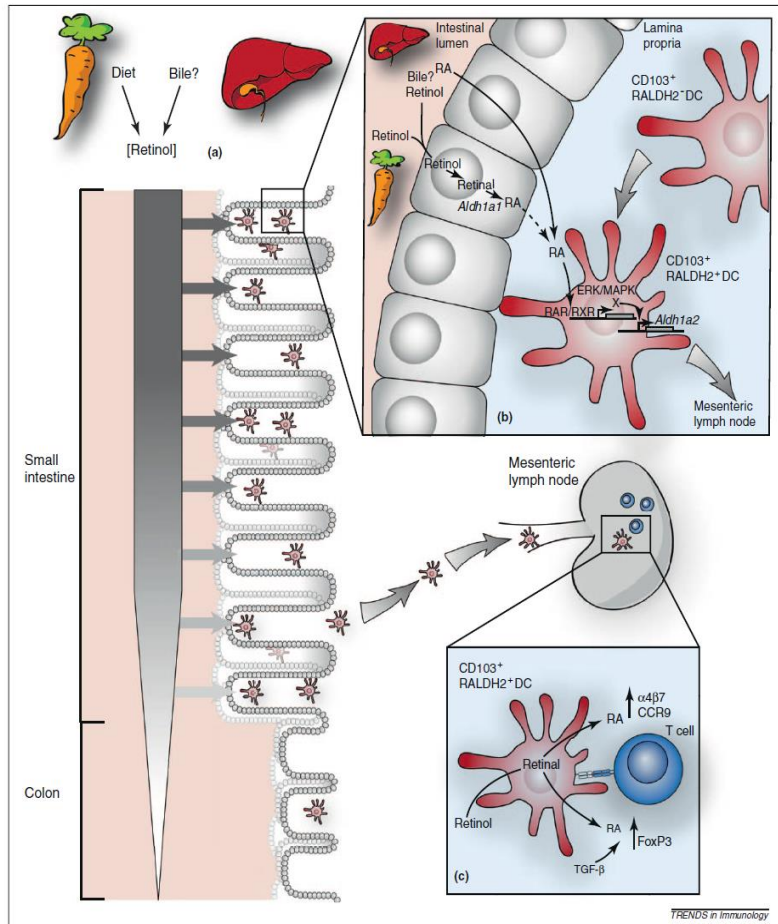


Figure 11: La sécrétion d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques CD103+ du ganglion mésentérique

D'après "How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa", Agace et al, Trends in immunology, 2012

- (a) Le rétinol est apporté au niveau de l'intestin grêle par l'alimentation ou la bile.
- (b) Le rétinol est métabolisé en rétinal puis en acide rétinoïque au niveau des cellules épithéliales intestinales. L'acide rétinoïque va entraîner l'expression de la RALDH (rétinaldéhyde déshydrogénase) sur les cellules dendritiques CD103+ qui vont ensuite migrer jusqu'aux ganglions mésentériques.
- (c) Au niveau des ganglions mésentériques, les cellules dendritiques CD103+ RALDH+ vont métaboliser le rétinol en rétinal puis en acide rétinoïque induisant ainsi l'expression de molécules de domiciliation vers l'intestin (CCR9 ; $\alpha 4\beta 7$) sur les lymphocytes T et la génération de lymphocytes T régulateurs Foxp3+ in situ.

- La génération de lymphocytes T régulateurs

La troisième étape, après la migration des cellules dendritiques CD103+ au niveau du MLN est la génération de lymphocytes T régulateurs. L'administration d'antigène par voie orale peut donner lieu à deux types de réponses en fonction de la dose administrée (Friedman and Weiner, 1994) : une forte dose d'antigène induit une anergie et une délétion des lymphocytes T activés avec peu ou pas de suppression active alors qu'une ou plusieurs administrations d'une faible dose d'antigène induit au contraire des mécanismes de régulation active impliquant la présence de lymphocytes T particuliers dits régulateurs capables de contrôler l'action des lymphocytes T effecteurs et des cellules présentatrices d'antigène. Même si l'anergie sera étudiée plus en profondeur dans les années 90, c'est le concept de régulation active qui sera privilégié dans la grande majorité des cas.

Dans les années 90, l'implication de la sécrétion de TGF- β par des lymphocytes T suppresseurs a été mise en évidence dans plusieurs modèles de tolérance orale notamment dans l'encéphalomyélite auto-immune où l'administration par voie orale de protéine basique de myéline induit une suppression

des réponses immunes soit via l'intervention de lymphocytes T CD8+ sécréteurs de TGF- β (Miller et al., 1992) soit par celle de lymphocytes T CD4+ eux aussi sécréteurs de TGF- β (Chen et al., 1994). Le rôle essentiel de la sécrétion de TGF- β dans l'induction de tolérance orale fut ensuite confirmé dans d'autres modèles murins comme la colite (Neurath et al., 1996) où l'administration orale préalable de l'agent responsable de la colite prévient le développement de cette maladie ou encore dans un modèle d'induction de tolérance orale à l'encontre d'un antigène considéré comme alimentaire (HEL : lysozyme d'œuf de poule) (Friedman and Weiner, 1994). Dans ces deux cas, une sécrétion accrue de TGF β par les lymphocytes T CD4+ est observée et l'administration d'anti TGF- β annule les effets suppressifs observés à la fois in vitro et in vivo. Ces lymphocytes T CD4+ sécrétant du TGF- β ont été par la suite définis comme des lymphocytes T régulateurs de type Th3 (Weiner, 2001a). Cependant, cette caractérisation intervenant historiquement avant la mise en évidence de Foxp3 pose la question de la similarité entre les lymphocytes Th3 et les lymphocytes Treg Foxp3+. Les liens étroits existant entre TGF- β et Foxp3 ainsi que les caractéristiques phénotypiques comparables entre Treg Foxp3+ et Th3 remettent en question la différence entre ces deux types de cellules (Pabst and Mowat, 2012). L'identification du marqueur LAP (latency-associated peptide), essentiel à l'assemblage et la sécrétion du TGF- β (Miyazono et al., 1991), sur des lymphocytes régulateurs Th3 non Foxp3, d'une part au cours de l'administration d'anti-CD3 par voie orale pour inhiber l'encéphalomyélite auto-immune (Chen et al., 2008) et d'autre part dans un modèle de suppression d'inflammation allergique (Duan et al., 2011) avance cependant des pistes sur la possible distinction entre lymphocytes T régulateurs Th3 et lymphocytes T régulateurs Foxp3+.

Après la mise en évidence du TGF- β comme facteur essentiel de la tolérance orale, l'identification du CD25 comme marqueur de lymphocyte T régulateur a permis de démontrer l'induction de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ par l'administration orale d'un antigène. Ces lymphocytes T régulateurs ont des propriétés régulatrices in vitro (diminution de la prolifération spécifique de l'antigène) et sont également capables d'induire de la régulation in vivo lorsqu'ils sont transférés adoptivement (Zhang et al., 2001). Enfin, après l'identification de Foxp3 comme facteur de transcription essentiel des Treg, au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin, la génération de lymphocytes T régulateurs Foxp3+ a également été démontrée dans des modèles d'induction de tolérance orale notamment dans un modèle de transfert adoptif de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'ovalbumine et suite à une administration orale d'OVA (Nagatani et al., 2004). L'induction de Treg Foxp3+ a également été démontrée dans les ganglions mésentériques dans le cas où l'antigène est couplé à la toxine cholérique (Sun et al., 2006). Enfin, l'importance de l'induction des lymphocytes Treg Foxp3+ a été confirmée dans un modèle d'induction de tolérance orale à l'encontre d'OVA (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2005). Dans ce cas, l'induction des lymphocytes T régulateurs Foxp3 en réponse à un antigène administré oralement dépend de la sous-population spécifique de cellules dendritiques CD103+ décrite précédemment. La génération de ces lymphocytes Treg Foxp3+ dépend également majoritairement du TGF- β ainsi que de l'acide rétinoïque, cofacteur amplifiant la génération de lymphocytes T régulateurs Foxp3+ en présence de TGF- β notamment au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin (Benson et al., 2007; Mucida et al., 2007; Sun et al., 2007)

Enfin, les Tr1 sécrétant de l'IL-10 ont également été mis en évidence comme potentiels acteurs de la tolérance orale (Battaglia et al., 2004) notamment dans un modèle de protection contre l'encéphalite auto-immune expérimentale en association avec l'IL-4 (Rizzo et al., 1999) ou encore suite à l'administration de petites doses de lacto-globuline induisant des lymphocytes T régulateurs suppressifs sécrétant de l'IL-10 (Tsuiji et al., 2001). Enfin l'administration conjointe d'IL-10 et d'antigène

par voie orale permet d'améliorer les réponses régulatrices induites à des doses d'antigènes n'induisant normalement pas de tolérance orale à la fois dans un modèle de protection contre l'encéphalomyélite auto-immune et le diabète auto-immun mettant ainsi en évidence le rôle probable de l'IL-10 comme molécule régulatrice au cours de la tolérance orale (Slavin et al., 2001).

Les liens étroits existant entre TGF- β , lymphocytes Treg Foxp3 et IL-10 mettent en évidence que les différentes populations de lymphocytes T régulateurs peuvent jouer des rôles similaires indépendamment ou en synergie au cours de la tolérance orale (Maynard et al., 2012). Il paraît évident que l'induction de la tolérance orale nécessite de nombreux acteurs au vu de son importance majeure dans les régulations des réponses immunitaires à l'encontre des antigènes intestinaux tant au niveau local de la muqueuse intestinale qu'au niveau systémique.

- Le retour des lymphocytes T régulateurs à la lamina propria

Suite à leur différenciation au niveau des ganglions mésentériques, les lymphocytes T régulateurs Foxp3 qui expriment des molécules de domiciliation à la muqueuse intestinale vont retourner au niveau de la lamina propria afin d'y créer un environnement pro-toléro-gène et protecteur. Ainsi, l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ sur les lymphocytes T et de son ligand Madcam1 sur les cellules épithéliales intestinales d'une part, et l'expression du CCR9 sur les lymphocytes T et de son ligand CCL25 sur les cellules endothéliales d'autre part, sont essentielles à la relocalisation des lymphocytes T régulateurs et sans cette étape, la tolérance orale ne peut pas être mise en place même si la génération des lymphocytes T régulateurs n'est pas affectée. Cette dernière étape apparaît donc également comme une étape clé dans l'établissement de la tolérance orale (Hadis et al., 2011). Il apparaît également que ces lymphocytes T régulateurs subissent une deuxième expansion suite à leur arrivée dans la lamina propria. Pour cette étape, la présence de cellules présentatrices d'antigène et d'un environnement cytokinique pro-toléro-gène est indispensable. Ainsi, deux études ont avancé l'importance de la sécrétion d'IL-10 par des cellules myéloïdes dans l'induction et le maintien des lymphocytes T régulateurs Foxp3 au niveau de la lamina propria (Denning et al., 2007; Murai et al., 2009). Une étude plus récente a démontré que l'accumulation des lymphocytes T régulateurs au niveau de la lamina propria était due à des macrophages intestinaux CX3CR1+. L'expression du CX3CR1 sur ces macrophages n'interfère pas sur la génération des lymphocytes T régulateurs Foxp3 ni sur leur migration à la lamina propria mais est essentielle à la sécrétion d'IL-10 qui permet d'induire une prolifération et un maintien des lymphocytes T régulateurs à la lamina propria. Ces macrophages intestinaux sont donc nécessaires pour le maintien d'un environnement pro-toléro-gène essentiel à la tolérance orale au niveau de la muqueuse intestinale.

Tous ces mécanismes mettent en évidence les facteurs clés de l'induction et du maintien de la tolérance orale dans sa composante locale. Cependant, comme énoncé précédemment, le principe fondamental de la tolérance orale est sa capacité à s'étendre de manière systémique. Encore très peu d'études se sont intéressées à ce processus mais il semble que la dissémination des lymphocytes T régulateurs dans la circulation lymphatique et sanguine soit la voie privilégiée afin d'expliquer ce phénomène.

➤ Modèle de tolérance orale

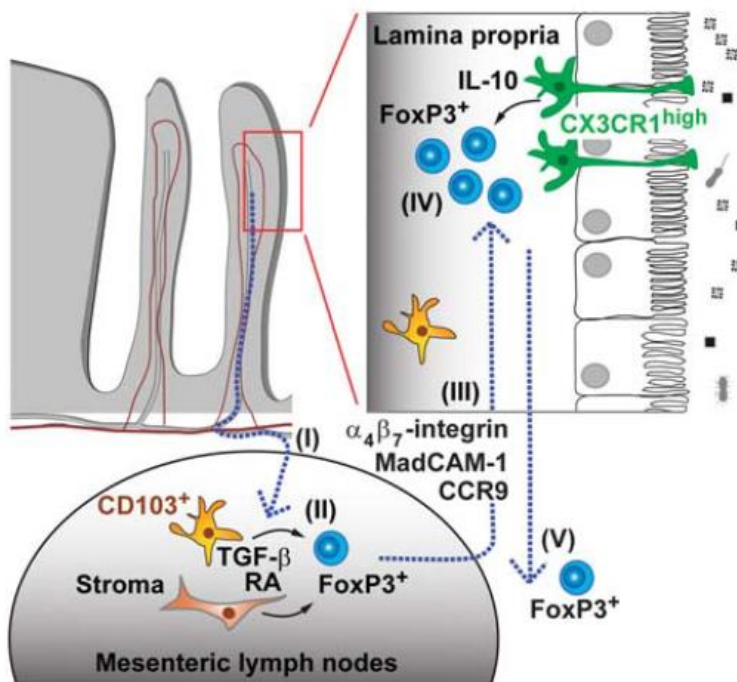


Figure 12: Modèle de tolérance orale

D'après: « Oral tolerance to food protein » Pabst and Mowat, Mucosal immunology, 2012

La tolérance orale est initiée par la migration des cellules dendritiques CD103⁺ de la lamina propria au ganglion mésentérique (MLN, I). Dans le ganglion mésentérique, l'acide rétinoïque produit par les cellules dendritiques et les cellules stromales va induire l'expression de molécules de domiciliation à la muqueuse intestinale sur les lymphocytes T (CCR9 et $\alpha_4\beta_7$) et induire leur différenciation en lymphocytes T régulateurs FoxP3 grâce au TGF- β présent dans le ganglion (II). Ces lymphocytes T régulateurs vont retourner à la lamina propria et continuer à s'expander grâce à l'IL-10 produite par les macrophages CX3CR1⁺ de la lamina propria créant ainsi un milieu pro-tolérrogène (IV). Dans une possible dernière étape, les lymphocytes T régulateurs vont rejoindre la circulation systémique afin d'étendre la tolérance à tout l'organisme (V).

c) Les différents modèles expérimentaux de tolérance orale

Comme énoncé précédemment, la tolérance mise en place par voie orale au niveau de la muqueuse intestinale s'étend de manière systémique à tout l'organisme, mettant ainsi en avant une puissante capacité préventive ou thérapeutique contre le rejet de greffe, l'auto-immunité et les maladies inflammatoires chroniques. De plus, elle apparaît également comme une alternative intéressante aux traitements immunosuppresseurs mis en place au cours de ces pathologies at qui peuvent avoir des effets secondaires indésirables majeurs (tels que les stéroïdes) (Mayer and Shao, 2004). Ainsi, un certain nombre de modèles animaux de maladies humaines ont été efficacement mis en place afin d'étudier les implications préventives ou thérapeutiques de la tolérance orale

- L'encéphalite auto-immune expérimentale : L'EAE est un modèle animal de maladie auto-immune dirigée contre le système nerveux central et qui induit la dégradation de la myéline des fibres nerveuses. Elle se rapproche de la sclérose en plaque chez l'Homme. C'est une maladie aux symptômes neurologiques très variés et qui peut altérer entre autres le mouvement, la perception, la mémoire ou la parole. Le modèle murin le plus classique d'EAE consiste en l'injection de la protéine basique de myéline (MBP) dans de l'adjuvant complet de Freund. Les premières études de l'induction de tolérance orale pour protéger contre le

développement de l'encéphalite auto-immune expérimentale ont eu lieu à la fin des années 80. Même si deux protéines ont été utilisées pour induire de la tolérance orale dans des modèles murins d'EAE, la MBP et la protéine proteo-lipide (PLP), c'est en général l'administration de MBP qui reste la plus étudiée et la plus efficace. Ainsi, l'administration par voie orale de la MBP permet d'inhiber les manifestations cliniques et histo-pathologiques de la maladie. La suppression des symptômes est beaucoup plus efficace si l'administration de la protéine par voie orale intervient de manière préventive, avant l'induction de la maladie mais l'administration orale d'MBP peut également être utilisée de manière thérapeutique lorsque la maladie a déjà été induite (al-Sabbagh et al., 1994). Les réponses cellulaires et humorales spécifiques de l'antigène administré et de l'espèce de laquelle est issu l'antigène sont également diminuées par l'induction de tolérance orale à l'encontre d'MBP (Bitar and Whitacre, 1988; Higgins and Weiner, 1988). Selon les doses administrées, l'inhibition de l'EAE résulte en une anergie clonale des lymphocytes T (à forte dose) ou en une suppression active cellulaire transférable via des lymphocytes T régulateurs (à faibles doses répétées) (Chen et al., 1994; Whitacre et al., 1991). Dans le modèle induisant des lymphocytes T régulateurs, l'administration de MBP induit une diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF ou l'IFN- γ et une sécrétion augmentée de TGF- β au niveau du système nerveux central (Khouri et al., 1992). Les lymphocytes T CD4⁺ mais également les lymphocytes T CD8⁺ ont été mis en évidence comme protecteurs dans ce modèle (Chen et al., 1995).

- L'arthrite: La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune dirigée principalement contre la membrane synoviale au niveau des articulations. Ses causes sont encore aujourd'hui inconnues et elle résulte en des douleurs articulaires parfois insoutenables. Il existe différents modèles animaux d'induction d'arthrite dont les plus connus sont: l'arthrite induite par l'injection systémique de collagène de type II avec un adjuvant, par l'injection intra articulaire d'adjuvant seul tel que le CFA (adjuvant complet de Freund) ou d'antigène tel que la BSA (Bendele, 2001). Une des premières études démontrant la possibilité d'induire une protection via l'induction de tolérance orale fut effectuée grâce à l'administration par voie intra-gastrique de collagène de type II dans le modèle correspondant. L'induction de tolérance orale permet de retarder l'apparition de la maladie et d'en inhiber les symptômes (Thompson and Staines, 1986) voire même de totalement inhiber l'apparition de la maladie, selon les souches utilisées (Nagler-Anderson et al., 1986). L'administration par voie orale du peptide immuno-dominant du collagène suffit à induire une protection contre la maladie en induisant une diminution de la prolifération des lymphocytes T et de la production d'anticorps à la fois en prévention mais également en thérapeutique, après l'immunisation (Khare et al., 1995). Par la suite, l'administration de collagène de type II par voie orale a également été mise en évidence dans les autres modèles d'arthrite. Par exemple, l'administration de collagène de type II permet de réduire l'incidence de l'arthrite induite par adjuvant seul. Cette suppression est transférable suite au transfert adoptif de lymphocytes T et n'est induite qu'à faibles doses de protéine administrée oralement démontrant le rôle majeur des lymphocytes T régulateurs dans ce modèle de tolérance orale (Zhang et al., 1990). Le modèle d'arthrite utilisant un antigène utilise un modèle d'injection systémique de BSA et d'adjuvant suivie d'une injection intra articulaire de BSA. Dans ce modèle, l'administration par voie orale de collagène à faibles doses induit également une diminution des symptômes de la maladie (Yoshino et al., 1995). Là encore, la protection est observée à faibles doses de collagène, démontrant toujours

l'induction d'une protection active même si l'anergie a également été évoquée dans ce dernier modèle (Inada et al., 1997). L'administration par voie orale de la BSA induit également de la tolérance orale mais uniquement en prévention de la maladie (Yoshino, 1995). Enfin dans la plupart de ces modèles, d'autres études mettent en avant le rôle majeur de l'IL4 dans la protection observée par l'administration par voie orale du collagène dans le modèle d'arthrite dépendant du collagène (Yoshino, 1998) et de l'antigène dans le modèle d'arthrite dépendant de l'antigène (Yoshino and Yoshino, 1998).

- Le diabète : Cette maladie auto-immune est due à une destruction des ilots beta du pancréas, responsables de la sécrétion d'insuline, par des lymphocytes T. Elle résulte en une hyperglycémie postprandiale suivie par des épisodes d'hypoglycémie majeurs entre les repas. Chez la souris, le modèle le plus courant pour étudier le diabète auto-immun de type 1 est la souris génétiquement modifiée NOD (non-obese diabétique). Ces souris développent spontanément un diabète (dans 60 à 80% des cas) dû à une infiltration lymphocytaire pancréatique. L'administration par voie orale d'insuline permet de retarder voire même d'inhiber l'apparition de la maladie chez les souris NOD sans modifier la glycémie sanguine. Elle diminue également la sévérité de l'infiltration lymphocytaire des ilots pancréatiques. Cette protection est transférable via le transfert adoptif des lymphocytes T démontrant une protection cellulaire active (Zhang et al., 1991). L'administration orale d'insuline protège également contre le développement du diabète dans un modèle de diabète induit par une infection virale par un LCMV (chorioméningite lymphocytaire) modifié pour être sous le contrôle du promoteur de l'insuline (von Herrath et al., 1996). Dans les deux cas, la protection est associée à une sécrétion de cytokines protectrices au niveau des ilots de Langerhans (IL4, IL10 et TGF-beta). Le TGF-beta semble induire une modification des cellules présentatrices d'antigène, les dirigeant vers une réponse de type Th2 (King et al., 1998). L'administration uniquement de la chaîne B de l'insuline, un peptide immuno-dominant de 30 acides aminés, suffit à ralentir le développement du diabète et en inhibe même son apparition chez les souris NOD. Cet effet est associé à une diminution de l'IFN-g, une augmentation de l'IL4, l'IL10 et du TGF-beta (Polanski et al., 1997). L'administration répétée de composés microbiens tels que le LPS à des souris NOD permettent de désensibiliser les macrophages et les cellules présentatrices d'antigènes et ainsi de biaiser la réponse Th1 initialement générée au niveau du pancréas vers une réponse de type Th2. Ainsi l'administration orale d'insuline associée à ces composés microbiens permet d'améliorer l'induction de tolérance orale à l'insuline et de mieux prévenir le développement du diabète (Bellmann et al., 1997).
- L'allergie : voir le chapitre sur les allergies et l'immuno-thérapie par voie sublinguale
- La maladie du greffon contre l'hôte est une maladie qui touche une multitude d'organes et se développe suite à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. La pathogénèse implique la reconnaissance d'antigènes allo-réactifs, l'activation des lymphocytes T et d'autres cellules immunocompétentes et la destruction des tissus (Ferrara and Deeg, 1991). L'administration par voie orale de splénocytes provenant du donneur avant la transplantation de moelle osseuse prévient le développement de la pathologie inflammatoire notamment au niveau de la destruction des tissus (Nagler et al., 2000), sans altérer la prise de la greffe (Nagler et al., 2003)

d) Rôle du microbiote intestinal

Parmi les facteurs pouvant influencer l'induction de tolérance orale, le microbiote intestinal est aujourd'hui largement exploré. Comme énoncé précédemment, le tractus gastro-intestinal est constamment exposé à un nombre et une variété considérables de bactéries commensales. Ces bactéries constituent le microbiote intestinal. Le microbiote interagit avec le système immunitaire de l'hôte induisant l'accumulation de diverses populations lymphocytaires au niveau de la muqueuse intestinale en fonction des différentes populations bactériennes (Round and Mazmanian, 2009) (voir Figure 13).

L'analyse du rôle des bactéries commensales sur les réponses immunitaires se base notamment sur une notion bien établie, la théorie de l'hygiène. Cette théorie indique qu'une diminution de l'exposition aux agents infectieux via l'amélioration de l'hygiène et l'utilisation d'antibiotiques, altère les mécanismes de régulation immunitaire, entraînant une augmentation de l'auto-immunité et des maladies allergiques (Bach, 2002). Par la suite, il fut avancé que des modifications de la composition du microbiote intestinal pendant l'enfance pouvaient être une piste pour expliquer « l'épidémie » récente de maladies allergiques (Noverr and Huffnagle, 2005; Penders et al., 2007). Des études ont ensuite confirmé qu'une diversité dans les bactéries commensales pendant l'enfance permettait de diminuer le risque atopique (Abrahamsson et al., 2012, 2014; Sjögren et al., 2009)

Des études chez la souris adulte ont également mis en évidence que la composition du microbiote intestinal pouvait influencer de manière importante les réponses immunitaires localement et de manière systémique. Selon les bactéries considérées et les conditions, cette influence peut être à la fois pro ou anti-inflammatoire. La maintenance de l'homéostasie intestinale et les réponses inflammatoires résultant de son altération semblent être corrélées avec les sous-types bactériens composant le microbiote (Garrett et al., 2010). Par exemple, la bactérie segmentaire filamenteuse induit une réponse Th17 au niveau de l'intestin, qui joue un rôle dans la résistance de l'hôte aux pathogènes intestinaux et peut induire une auto-immunité systémique (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009).

Malgré des résultats contradictoires sur la capacité des souris « germ-free » à induire de la tolérance orale en fonction de l'antigène considéré (Prioult et al., 2003; Walton et al., 2006), l'impact de différentes souches de bactéries sur le développement de la tolérance orale est totalement envisageable. En effet, il semblerait que le nombre et la fonction des lymphocytes T régulateurs soient directement influencés par les bactéries commensales.

- L'administration quotidienne à des souris de probiotiques avec des souches particulières de bifidobacterium ou lactobacilles modifie le statut inflammatoire des souris grâce à l'induction de lymphocytes T régulateurs dans un modèle de colite (Di Giacinto et al., 2005) ou de maladie allergique (Karimi et al., 2009).
- *Bacteroides fragilis*, via son composé immuno-modulateur, le PSA (polysaccharide A), induit également la génération de lymphocytes T régulateurs Foxp3+ au niveau du colon et chez une souris « germ-free » mono colonisée, *B. fragilis* augmente la capacité suppressive des lymphocytes T régulateurs et induit leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 au niveau de la muqueuse intestinale. Le traitement au PSA permet de prévenir l'induction de réponses inflammatoires au niveau de l'intestin mais également de les

supprimer comme, par exemple, dans un modèle de colite expérimentale. Ceci démontre le rôle important de cette bactérie dans le maintien de la tolérance muqueuse (Round and Mazmanian, 2010).

- Les clostridium peuvent également jouer un rôle majeur dans l'induction des lymphocytes T régulateurs Foxp3 au niveau de la muqueuse intestinale et plus particulièrement au niveau du colon grâce à leur enrichissement du milieu en TGF- β à la fois chez la souris (Atarashi et al., 2011) et chez l'homme (Atarashi et al., 2013). Au cours du développement post-natal, la colonisation bactérienne progressive par les clostridium est directement associée à l'ontogénie de la capacité à générer des lymphocytes T régulateurs (Atarashi et al., 2011). Enfin, l'administration orale de ce type de bactéries permet de prévenir l'induction de colite et d'allergie alimentaire (Atarashi et al., 2011).
- D'autres études tendent à démontrer que les bactéries commensales associeraient leurs fonctions métaboliques à leur impact sur la balance pro/anti-inflammatoire. Ainsi la génération de métabolites telles que le butyrate ou le propionate par les bactéries du microbiote intestinal joue un rôle essentiel sur la génération de lymphocytes T régulateurs (Maslowski and Mackay, 2011).

Toutes ces études démontrent un lien très clair entre sous-types bactériens et lymphocytes T régulateurs, qui sont à l'origine du maintien de l'homéostasie intestinale et de la tolérance orale. Cependant la plupart de ces études étudient l'induction de lymphocytes T régulateurs au niveau du colon, il reste donc à démontrer comment ces lymphocytes T régulateurs présents dans le colon peuvent participer à la tolérance orale contre les antigènes administrés par voie orale et qui pénètrent l'organisme au niveau de la lumière intestinale de la partie supérieure du tractus gastro-intestinal.

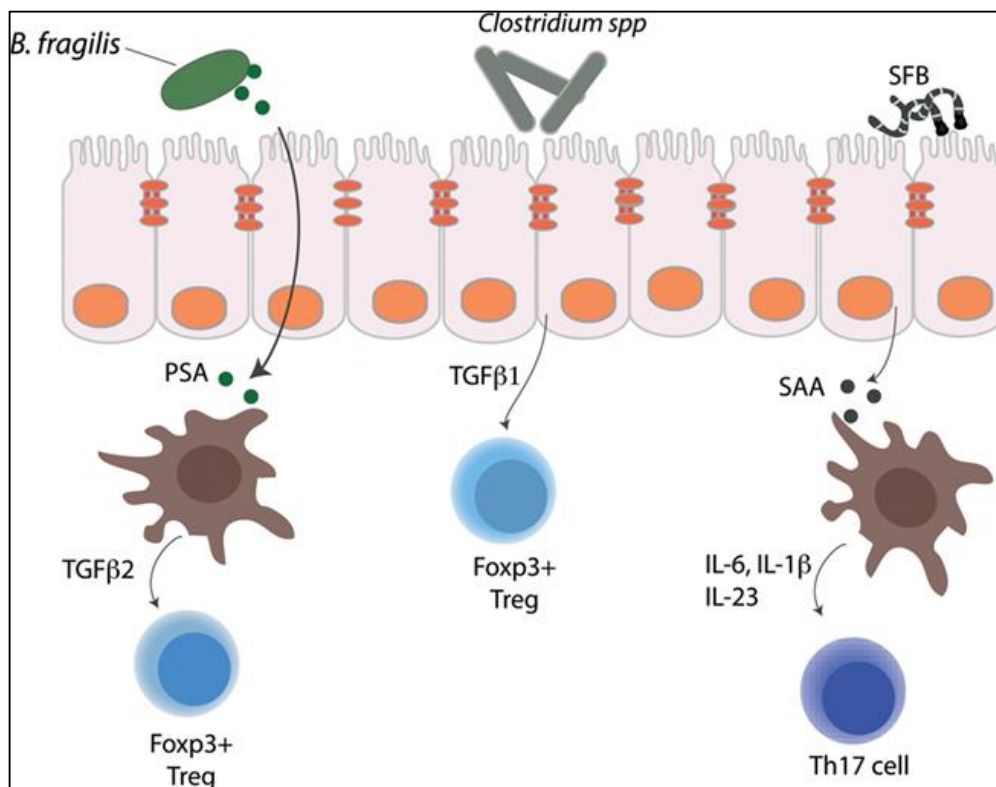


Figure 13: Impact de différentes souches bactériennes du microbiote sur le développement des réponses immunitaires

D'après "The gut microbiota and mucosal T cells", Smith and al, Frontiers in microbiology, 2011

2) La tolérance orale chez le nouveau-né

a) Un défaut d'induction de tolérance orale...

Alors que la tolérance orale est un mécanisme immunologique bien étudié chez l'adulte, très peu d'études ont examiné la tolérance orale chez le nouveau-né. Au vu de l'impact majeur sur les réponses régulatrices développées au niveau du système immunitaire de la muqueuse intestinale par le contact avec un antigène alimentaire et l'effet systémique de la tolérance ainsi développée, il apparaît pourtant essentiel de savoir si le même processus se développe chez le nouveau-né. En effet, c'est durant cette période cruciale que l'individu est exposé pour la première fois à de hauts taux d'antigènes. Ainsi, c'est également durant cette période critique que le système immunitaire a le choix de mettre en place une réponse immunitaire protectrice et régulatrice ou au contraire une réponse inflammatoire souvent délétère.

Les études réalisées chez le nouveau-né ont en grande majorité mis en évidence un défaut dans le développement de la tolérance orale. Les premières analyses ont été réalisées au début des années 80. La première d'entre elles s'est intéressée principalement à l'effet de l'administration orale d'un antigène classique d'ovalbumine sur les réponses humorales à l'âge adulte. Ainsi, cette étude a démontré que l'administration d'ovalbumine en tout début de vie (avant le 2^{ème} jour) induit une réponse immunitaire humorale pro-inflammatoire lors de l'immunisation ultérieure à l'encontre de l'OVA. Les premiers effets de la tolérance orale apparaissent à partir du 7^{ème} jour et il faut attendre la deuxième semaine pour obtenir une réponse régulatrice équivalente à celle observée chez l'adulte (Hanson, 1981). Cependant, l'induction de tolérance orale chez le nouveau-né semble être dépendante de l'antigène considéré et de la dose administrée. Ainsi l'administration de faibles doses de γ -globuline humaine (0,01 à 1mg/g) induit de la tolérance dès les premiers jours de vie alors que des doses plus faibles peuvent également induire un priming. L'absorption de cette protéine est cependant meilleure chez le nouveau-né que l'ovalbumine, mettant en avant le rôle probable de la barrière intestinale dans l'induction de la tolérance orale chez le nouveau-né (Brambell, 1966). Une autre étude a confirmé l'absence de tolérance orale en tout début de vie grâce à une étude des réponses humorales et cellulaires. En effet, l'administration d'une dose d'ovalbumine connue pour induire de la tolérance orale chez l'adulte donne lieu à une réponse inflammatoire à la fois humorale et cellulaire lorsqu'elle est administrée en début de vie (Strobel and Ferguson, 1984). De plus, cette réponse est amplifiée lorsque le nouveau-né a reçu l'antigène par voie placentaire. Cependant, en essayant de moduler ou d'inverser l'activation induite en tout début de vie, les auteurs ont également mis en évidence qu'une administration continue de l'antigène à petites doses dès le premier jour permet d'induire de la tolérance orale alors qu'une seule administration n'y parvient pas. La tolérance orale semble être bien établie seulement à partir du 10^{ème} jour de vie, ce qui corrèle avec la mise en place d'une fonction intestinale mature avec une perméabilité aux macromolécules limitée. En effet, la digestion des macromolécules et les fragments qui passent la barrière intestinale peuvent être à la fois immunogènes ou pro-toléroènes. Un défaut de digestion et d'absorption des molécules administrées par voie orale pourraient expliquer le priming observé au cours de la première semaine de vie. Il semblerait donc également y avoir une corrélation entre l'ontogénie du tractus gastro-intestinal et l'acquisition de la tolérance orale. Une autre étude a ensuite confirmé ces résultats chez le rat dans un

autre modèle, l'encéphalomyélite auto-immune. Ainsi, alors que l'administration par voie orale de protéine basique de myéline induit de la tolérance orale après la 4^{ème} semaine, la même administration chez le nouveau-né induit un priming des réponses immunitaires et une encéphalomyélite auto-immune majeure (Miller et al., 1994). Ces auteurs ont également démontré qu'il était possible d'induire de la tolérance systémique à l'encontre du même antigène, démontrant ainsi un défaut spécifique de la tolérance par voie orale. Contrairement à cette étude, d'autres auteurs ont mis en évidence que l'administration par voie orale d'insuline induisait une tolérance efficace et réduisait le développement du diabète de type 1 chez des souris NOD (Maron et al., 2001). Ceci démontre bien l'impact majeur du type d'antigène considéré pour l'induction de tolérance orale. En conclusion, contrairement aux études pionnières avançant l'idée que le nouveau-né était programmé pour être tolérant (Billingham et al., 1953), il apparaît que la tolérance orale suite à l'administration directe par voie orale d'un antigène au nouveau-né n'est pas aussi simple à obtenir. Il s'avère que les antigènes, les doses ou la fréquence d'administration utilisées chez l'adulte et qui permettent de prévenir le développement de maladies par l'induction de tolérance orale ne sont que rarement adaptées au nouveau-né. Ceci réaffirme encore une fois les spécificités propres au nouveau-né.

Deux facteurs peuvent expliquer ce défaut d'induction de tolérance orale

- Le tube digestif du nouveau-né : il a clairement été établi qu'une partie de la capacité tolérogénique d'un antigène dépendait de son passage par la muqueuse intestinale où il était modifié pour acquérir ses capacités pro-tolérogène (Bruce and Ferguson, 1986). En effet, la dégradation de l'antigène par les enzymes protéolytiques de l'intestin est essentielle pour qu'il acquière ses fonctionnalités pro-tolérogènes (Michael, 1989). Le fait que le pH gastrique du nouveau-né soit plus bas et que la sécrétion d'enzymes protéolytiques soit également modérée chez le nouveau-né (Agunod et al., 1969) pourrait expliquer en partie ce défaut de tolérance orale. D'autre part, la muqueuse intestinale du nouveau-né est beaucoup plus perméable aux macromolécules que celle de l'adulte. Même si le rôle de la perméabilité intestinale n'a pas été clairement établi dans la tolérance orale, une perméabilité intestinale élevée semble jouer un rôle dans le développement de l'allergie alimentaire (Forbes et al., 2008). La perméabilité intestinale accrue du nouveau-né pourrait donc être une piste permettant d'expliquer son défaut de tolérance orale.
- Les cellules dendritiques : Bien que les MLN soient bien présents chez le nouveau-né, très peu d'études se sont consacrées à l'étude des cellules dendritiques dans cet organe, se focalisant en grande majorité sur la rate. Cependant, certaines études ont démontré la présence de cellules dendritiques dans cet organe, exprimant le CMH II et capables de s'activer (Dakic et al., 2004). Ces études ne se sont pourtant pas intéressées à la fonctionnalité des cellules dendritiques mésentériques à capter et à présenter un antigène. Malgré les différentes études phénotypiques des cellules dendritiques ayant eu lieu chez le nouveau-né, une seule étude s'est intéressée à la proportion de cellules dendritiques CD103+ dans les MLN, démontrant un défaut de ces cellules en début de vie (Lantier et al., 2013). La sécrétion d'acide rétinoïque par ces cellules n'a cependant jamais été étudiée. Or la présence de cette molécule est une étape clé à l'induction de tolérance orale. La fonctionnalité des cellules dendritiques mésentériques, et plus particulièrement des cellules dendritiques CD103+ impliquées dans l'induction de tolérance orale, sera étudiée dans ma thèse.

b) ...compensé par l'allaitement maternel

L'administration directe d'un antigène par le lait maternel ne semble pas être un moyen efficace ni physiologique d'induire de la tolérance orale chez le nouveau-né. Au vu de l'impact majeur de l'allaitement sur les réponses immunitaires du nouveau-né, il est naturellement apparu qu'une administration indirecte de l'antigène via le lait maternel pourrait permettre d'améliorer l'induction de tolérance orale chez le nouveau-né. Une première étude a démontré que lorsqu'un antigène est injecté à la mère allaitante, cet antigène augmente dans le sérum des nouveau-nés, démontrant ainsi le passage de l'antigène via le lait maternel. Les auteurs ont ensuite démontré que des doses faibles d'antigène permettent de tolérer les nouveau-nés dès la première semaine (Komatsu et al., 1988). De même, dans l'étude de Strobel (Strobel, 1996), l'administration de l'antigène via l'allaitement permet d'induire de la tolérance orale à partir du 7^{ème} jour mais à des doses 1000 fois inférieures que lorsque le nouveau-né reçoit directement l'antigène. D'autres études ont ensuite confirmé la capacité du lait maternel à faciliter l'induction de tolérance orale chez le nouveau-né et d'inhiber les réponses immunitaires spécifiques de l'antigène à l'âge adulte (Korotkova et al., 2004; Verhasselt et al., 2008). La présence dans le lait maternel d'antigènes à l'origine de réponses immunitaires auto-immunes telles que l'insuline pour le diabète auto-immun (Tiittanen et al., 2006) ou la gliadine pour la maladie cœliaque (Chirido et al., 1998) ainsi que d'antigènes alimentaires à l'origine d'allergies tels que la cacahuète ou la β -lactoglobuline (Palmer and Makrides, 2006), confirme le rôle non négligeable que peut avoir le lait maternel dans l'administration de l'antigène par voie orale au nouveau-né. L'alimentation classiquement apportée au nouveau-né étant le lait maternel, il apparaît ainsi plus physiologique d'administrer un antigène au nouveau-né par le biais du lait maternel que par une administration directe afin d'induire de la tolérance orale. De plus, la présence de nombreux facteurs immuno-modulateurs dans le lait maternel permettrait d'influencer l'induction de tolérance orale :

- Le TGF- β

Le TGF- β est une molécule essentielle pour la régulation des réponses immunitaires. Alors que la muqueuse intestinale néonatale est pauvre en TGF- β , le lait maternel lui en est très riche, démontrant ainsi l'impact important que peut avoir le lait maternel sur les réponses immunitaires au niveau de l'intestin, notamment dans la tolérance orale (Penttila et al., 1998). Le rôle de cette molécule sur l'induction de tolérance orale a été mis en évidence suite à l'administration d'un lait sans TGF- β à la place du lait maternel, chez le rat. Dans ce cas, les nouveau-nés développent une inflammation intestinale (Penttila et al., 2003) et des réponses allergiques à l'encontre de la β -lactoglobuline (Penttila, 2006). Dans un modèle murin d'induction de tolérance orale à l'encontre de l'ovalbumine, la présence de TGF- β est nécessaire dans le lait maternel pour que le nouveau-né développe de la tolérance orale et soit protégé contre le développement d'allergie (Verhasselt et al., 2008). Chez l'Homme, le rôle du TGF- β du lait maternel a également été avancé comme une molécule essentielle dans la prévention des maladies allergiques (Oddy and Rosales, 2010).

- Les anticorps maternels (voir Figure 14)

Les IgA sont les anticorps présents en plus grande quantité dans le lait maternel notamment afin de compenser le manque d'IgA du nouveau-né. Même si leur rôle sur la protection contre les infections respiratoires et digestives a été bien démontré (Brandtzaeg, 2003), leur rôle ne semble pas essentiel dans l'induction de tolérance orale, ni chez l'adulte où la déficience en IgA n'impacte pas le

développement de tolérance orale (Karlsson et al., 2010), ni chez le nouveau-né (Mosconi et al., 2010). Les antigènes présents dans le lait maternel peuvent également être retrouvés associés en complexes immuns avec des IgG maternelles (Van de Perre, 2003). Dans un modèle murin, le passage de ces complexes immuns IgG/antigène du lait maternel au nouveau-né, a été mis en évidence comme inducteur de tolérance orale chez le nouveau-né. Cette protection, obtenue chez les mères sensibilisées, dure plus longtemps et est plus importante que lorsque l'antigène passe seul, non complexé avec un anticorps (Mosconi et al., 2010). Cette protection plus forte repose au moins en partie sur le transfert plus efficace de ces complexes immuns à travers la barrière intestinale du nouveau-né via le récepteur Fc néonatal (FcRn) (Qiao et al., 2007). De plus la glycosylation des anticorps pourraient également jouer un rôle sur la composante tolérogénique de ces complexes immuns (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

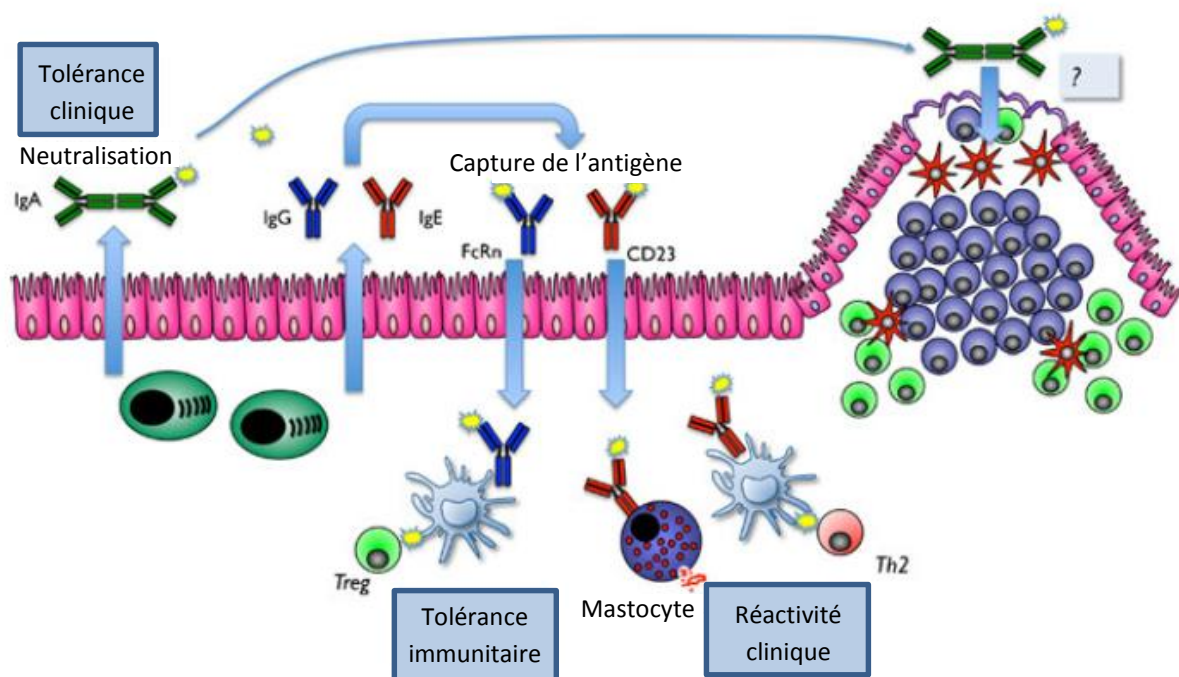


Figure 14: Impact du passage des anticorps du lait maternel sur le développement des réponses immunitaires du nouveau-né

D'après "Mucosal antibodies in the regulation of tolerance and allergy to foods", Berin, Seminars in immunopathology, 2012

Les IgA sécrétés au niveau de la barrière intestinale peuvent se lier aux antigènes et neutraliser leur interaction avec les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale participant ainsi de manière indirecte à la tolérance orale. Le passage des IgG via le FcRn contribue de manière importante à l'induction de la tolérance orale, grâce à l'induction de lymphocytes T régulateurs. Au contraire, le passage des IgE via le CD23 augmentent la réactivité aux antigènes présents dans le lait maternel, amplifiant ainsi les symptômes allergiques.

- **Autres facteurs**

La présence d'autres cytokines telles que l'IL-10, le TNF- α , l'IFN- γ ou l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13 dans des niveaux variables selon les laits maternels considérés pourraient également avoir un impact sur la composante plus ou moins pro-tolérologène des laits (Garofalo, 2010). La présence dans le lait maternel de facteurs de croissance et de réparation tels que l'EGF vont permettre de stimuler la maturation intestinale et l'intégrité de la barrière intestinale, ce qui va directement affecter le transfert de l'antigène à travers la barrière intestinale et donc l'induction de tolérance orale (Cummins and Thompson, 2002). Le ratio des acides gras n-6 et n-3 dans l'alimentation maternelle au cours de l'allaitement a été mis en évidence comme un facteur influençant le développement de la tolérance orale chez le rat (Korotkova et al., 2004). Enfin, l'administration de probiotiques au cours de l'allaitement semble également protéger les nouveau-nés contre le développement d'allergies (Rautava et al., 2002). Cependant, même si ces résultats restent controversés, une plus grande diversité du microbiote semble, elle directement corrélée à une prévention des maladies allergiques (Bjorksten, 2004).

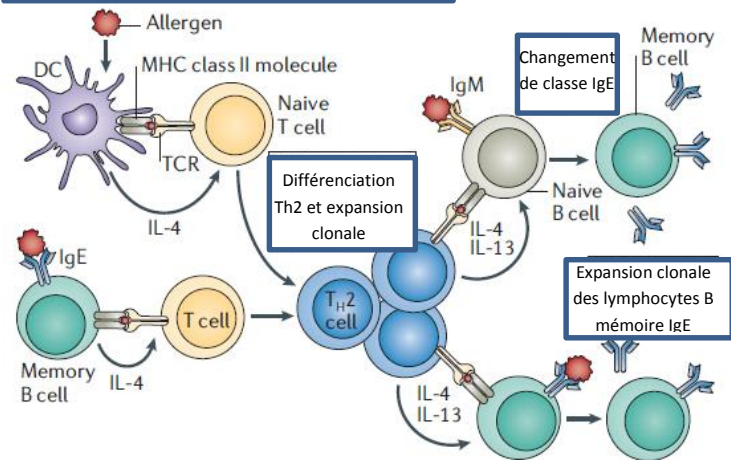
En conclusion, il apparaît difficile d'induire de la tolérance orale chez le nouveau-né mais le lait maternel, en tant que nourriture physiologique du nouveau-né permet d'apporter de nombreux antigènes dans des conditions pro-tolérologènes grâce à l'apport de nombreuses molécules immuno-modulatrices. Les variations de composition des différents laits maternels permettent d'expliquer les effets protecteurs variables de l'allaitement.

III) Maladies allergiques et tolérance orale

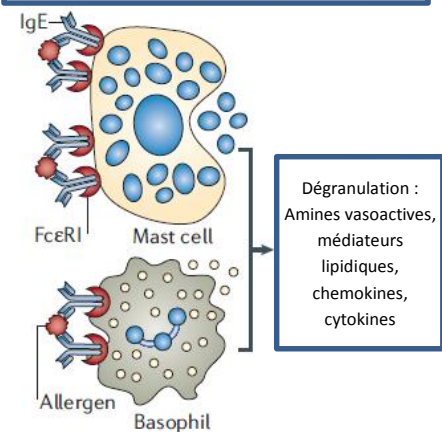
1) Mécanisme de l'allergie

L'allergie résulte d'interactions complexes entre des prédispositions génétiques (terrain atopique) et des facteurs environnementaux. Il a été estimé qu'une douzaine de gènes polymorphiques régulaient le développement de l'allergie en contrôlant les différents aspects de la réponse inflammatoire. Cependant, leur lien avec l'allergie est encore trop faible pour qu'ils soient utilisés comme facteurs prédictifs. 1) Chez un individu prédisposé génétiquement, la première exposition à un allergène induit la différenciation des lymphocytes T en Th2 qui sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13. Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécréteurs d'IgE et prolifèrent. Les IgE à la surface des lymphocytes B et les autres cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques facilitent la présentation de l'antigène. Le FcγRI (de haute affinité pour les IgE), présent à la surface des mastocytes et des basophiles va fixer les IgE sécrétés. A ce stade, l'individu est sensibilisé mais asymptomatique. Les expositions ultérieures à l'allergène vont induire la réaction allergique. 2) Les IgE capturent l'allergène et induisent la dégranulation des mastocytes, libérant ainsi divers médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la prostaglandine ou des leucotriènes dans la circulation sanguine, ainsi que des chémokines et des cytokines pro-inflammatoire. Cette phase est symptomatique et induit différents symptômes comme la rhinite et l'asthme pour les allergies respiratoires et la diarrhée ou les vomissements pour les allergies digestives. Dans les cas les plus graves, l'exposition à un allergène peut donner lieu à un choc anaphylactique, induisant une perméabilité accrue des capillaires sanguins, une chute de la pression artérielle et du débit cardiaque pouvant engager le pronostic vital (Larche et al., 2006). 3) L'inflammation allergique, la dernière phase de l'allergie, consiste en la migration aux sites de l'exposition à l'allergène, des lymphocytes T spécifiques de l'allergène qui sont réactivés et prolifèrent localement. Ainsi dans l'allergie respiratoire, des lymphocytes Th2, sécrétant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 sont retrouvés au niveau du poumon. Des cellules dendritiques pro-inflammatoires présentes elles aussi au niveau du site d'induction de l'allergie jouent un rôle majeur dans la réactivation des lymphocytes T et le maintien d'une inflammation locale. (Lambrecht and Hammad, 2003). Une sécrétion d'IgE locale est également observée dans les allergies respiratoires mais pas dans les allergies cutanées. Enfin une éosinophilie pulmonaire est également mise en place au cours de l'allergie respiratoire, les éosinophiles étant les cellules pro-inflammatoires les plus présentes notamment au niveau des poumons des individus asthmatiques. (Voir Figure 15).

1) Sensibilisation et induction de la mémoire



2) Phase immédiate : réaction de type 1



3) Phase tardive : inflammation allergique

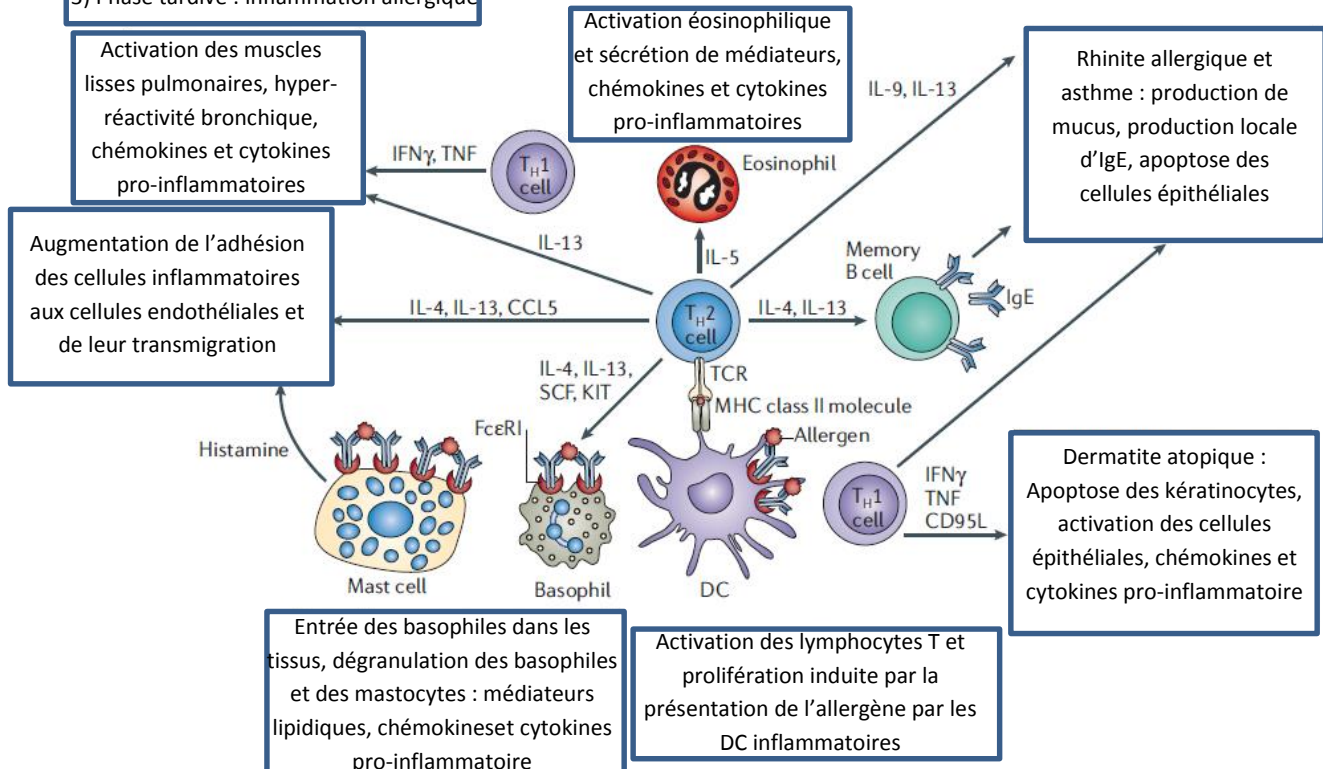


Figure 15: Mécanismes immunologiques de l'allergie

D'après "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy", Larche et al., Nature reviews immunology, 2006

2) Les maladies allergiques

L'OMS classe les maladies allergiques au 4^{ème} rang des affections chroniques mondiales et considère ces maladies comme un enjeu majeur de santé publique. L'allergie se déclare dans la plupart des cas chez l'enfant et le jeune adulte mais toutes les tranches d'âge sont concernées, avec des variations selon l'âge et les pays. La prévalence des maladies allergiques a considérablement augmenté au cours des 20-30 dernières années et on estime à 20-30% de la population mondiale la prévalence cumulée des maladies allergiques (rhinite, asthme, dermatite atopique, allergie alimentaire) (Eder et al., 2006). De nombreux facteurs environnementaux peuvent expliquer l'augmentation de cette prévalence comme le changement d'alimentation (Devereux, 2006), la pollution (Brauer et al., 2007) ou la consommation de tabac (Polosa et al., 2008). On peut décrire trois manifestations cliniques de l'allergie : l'allergie alimentaire, l'allergie respiratoire et la dermatite atopique.

a) Les allergies alimentaires

L'allergie alimentaire est une réponse inappropriée à un antigène consommé par voie orale. Les symptômes cliniques de l'allergie alimentaire vont de la gêne passagère locale à des réactions graves ou entraînant le pronostic vital qui nécessitent des soins médicaux immédiats (Sicherer, 2002). Les symptômes sont souvent cutanés (30 à 40% des dermatites atopiques sont la conséquence d'une allergie alimentaire), ou gastro-intestinaux avec l'apparition de diarrhées allergiques ou au contraire de constipation, mais peuvent aussi induire des œdèmes au niveau de la cavité buccale ou des voies aériennes jusqu'à un choc anaphylactique, notamment dans le cas de l'allergie à la cacahuète (Burks, 2008). La prévalence des allergies alimentaires est d'environ 1 à 3% chez l'adulte et de 4 à 6% chez l'enfant. Plus de 70 aliments peuvent être à l'origine de réactions allergiques mais parmi les cas les plus courants, on peut citer : les œufs, le lait de vache, les cacahuètes, les crustacés ou le gluten. La seule façon qu'ont les sujets allergiques de faire face à ces allergies est d'éviter la consommation des substances allergènes, ce qui, selon les aliments, peut s'avérer très compliqué au quotidien. En effet, une toute petite quantité d'un de ces aliments peut entraîner une réaction très grave voire mortelle. L'allergie alimentaire apparaît très fréquemment au cours de la première année de vie et est souvent transitoire. Par exemple, l'allergie au lait de vache apparaît dès les premiers mois de vie et disparaît spontanément dans 85% des cas au cours des trois premières années (Host, 2002). Il faut distinguer les allergies alimentaires dépendantes des IgE qui provoquent l'apparition de symptômes généralement quelques minutes à une heure après l'ingestion de l'allergène et qui peuvent perdurer jusqu'à plusieurs jours, et les allergies alimentaires qui ne sont pas dues aux IgE. On parle plutôt dans ce cas d'intolérance alimentaire ou d'hypersensibilité alimentaire non allergique. L'exemple le plus connu étant la maladie cœliaque ou intolérance au gluten (Di Sabatino and Corazza, 2009). Chez les individus allergiques, la tolérance orale à l'encontre de l'allergène d'intérêt ne s'est pas établie ou est rompue. La compréhension croissante des mécanismes à l'origine de la tolérance orale suggère ce processus comme une possible voie de thérapie.

b) Les allergies respiratoires

Au niveau des allergies respiratoires, les deux manifestations les plus courantes sont la rhinite allergique et l'asthme allergique. La rhinite allergique est la manifestation la plus courante et constante de l'allergie respiratoire (Greiner et al., 2011). La fréquence de celle-ci a été multipliée par quatre au cours des trois dernières décennies et elle touche actuellement 500 millions de personnes dans le monde. Bien que bénigne, cette affection pose un vrai problème de santé publique du fait de sa fréquence et de son impact important sur la qualité de vie. La rhinite se caractérise par la survenue régulière en dehors d'épisodes de rhume ou de grippe, d'éternuements, d'écoulement et d'obstruction nasaux et de signes conjonctivaux d'intensité variable : rougeur de l'œil, larmolement... Elle intervient généralement très rapidement après le contact avec l'allergène impliqué (par ordre d'importance : acariens, pollen, chat). L'asthme allergique est une maladie immunitaire chronique dont les premières manifestations surviennent le plus souvent chez l'enfant (Martinez and Vercelli, 2013). Elle se caractérise par une inflammation des voies aériennes et une hyperréactivité bronchique qui est responsable de divers phénomènes au niveau des voies respiratoires (œdème, contraction des muscles bronchiques, sécrétion de mucus) et qui provoquent une obstruction bronchique. Les crises entraînées par l'allergène sont des épisodes de gêne respiratoire (dyspnée) ou de respiration sifflante dus au rétrécissement des bronches. Dans certains cas, la toux peut être le seul symptôme. Entre les crises, la respiration est en principe normale et leur apparition est extrêmement variable même au sein d'un même individu. L'asthme allergique est la maladie chronique la plus commune parmi les enfants et touche aussi des millions d'adultes (WAO, 2006). Cette affection tend à se déclarer sur un mode épidémique et sa prévalence semble augmenter continuellement de 50% par décennie depuis ces 50 dernières années (Eder et al., 2006). L'asthme n'est pas un problème de santé publique limité aux pays développés puisqu'il est présent dans la plupart des pays en voie de développement et 80% des décès dus à l'asthme ont été enregistrés dans ces pays-là. La mortalité due à l'asthme n'est pas comparable à l'impact que cette maladie a sur la vie quotidienne des personnes atteintes. Le poids humain ainsi que le poids économique de cette maladie est lourd puisque l'OMS estime que les coûts associés à l'asthme au niveau mondial dépassent ceux associés à la tuberculose et au SIDA réunis.

c) La dermatite atopique

La dermatite atopique, ou eczéma, est une maladie allergique de la peau souvent associée à d'autres réactions allergiques comme la rhinite ou l'asthme. Il s'agit d'une inflammation chronique de la peau qui perturbe la fonction de barrière de l'épiderme et résulte d'une sensibilisation à des allergènes alimentaires ou environnementaux (Leung and Bieber, 2003). Les manifestations cliniques de la dermatite atopique varient en fonction de l'âge et on peut identifier trois étapes : dans la petite enfance, les premières lésions eczémateuses apparaissent généralement sur les joues et le cuir chevelu. En les grattant, l'individu fait apparaître des érosions au niveau des lésions. Durant l'enfance, les lésions s'étendent à la nuque et aux membres. A l'adolescence et à l'âge adulte, on observe une hyperplasie de la couche superficielle de l'épiderme au niveau des lésions et les démangeaisons deviennent intolérables et ont un impact majeur sur la qualité de vie de l'individu. La prévalence de cette maladie a doublé, voire même triplé, au cours de ces trois dernières décennies : 15 à 30% des enfants et 2 à 10% des adultes sont atteints de dermatite atopique. Elle se déclare dans la majorité des cas dans la petite enfance (85% des cas sont déclarés avant l'âge de 5 ans) et on observe fréquemment un rétablissement spontané au moment de l'adolescence (70% des cas).

3) Les traitements

a) Les traitements symptomatiques

Le premier traitement de l'allergie est l'éviction de l'allergène : en évitant tout contact avec l'allergène, on évite le déclenchement des symptômes. Il est cependant très difficile au quotidien d'éviter l'exposition aux acariens ou aux pollens qui sont les deux allergènes majeurs de l'environnement. Il faut d'une part adapter les lieux de vie et traiter les objets propices au développement des acariens (chaleur, humidité, nourriture...) et d'autre part, éviter de sortir pendant les périodes de pollinisation. Il semble donc essentiel qu'il existe des traitements efficaces des symptômes allergiques.

Les traitements symptomatiques sont prescrits par un médecin traitant et ont pour objectif de diminuer l'intensité des symptômes et de combattre l'inflammation causée par l'allergie. Tous ces médicaments ont une utilisation aujourd'hui maîtrisée et codifiée (WAO, 2006). Toutefois, en dépit de leur efficacité reconnue, ces traitements n'ont aucune action sur la cause de l'allergie. Les principales classes pharmacologiques utilisées dans l'allergie sont :

- les antihistaminiques qui réduisent ou empêchent les effets de l'histamine en agissant sur ses récepteurs, les anti-leucotriènes et les anti-dégranulants mastocytaires,
- les corticoïdes inhalés qui ont un effet anti-inflammatoire local et les corticoïdes administrés par voie systémique qui ont des effets secondaires non négligeables lorsqu'ils sont pris à long terme,
- les médicaments bronchodilatateurs ou β -mimétiques à action brève et rapide sont prescrits pour soulager une crise d'asthme ou des épisodes de toux, équivalents mineurs de l'asthme. Ils agissent contre le rétrécissement des bronches et leurs permettent de se dilater. Ils entraînent fréquemment une tachycardie. D'autres bronchodilatateurs peuvent être utilisés mais sont de moins en moins prescrits : les anticholinergiques et les théophyllines.
- Les biothérapies qui consistent en l'administration d'anticorps neutralisants des IgE, de l'IL-5 ou de l'IL-4.

b) L'induction de tolérance : l'immunothérapie

La seule thérapie curative est l'immunothérapie spécifique de l'allergène (Bousquet et al., 1998). Elle consiste en une faible administration répétée et croissante de l'allergène d'intérêt par voie sous-cutanée ou orale. Ces dernières années, l'immunothérapie par voie sublinguale est la voie privilégiée de thérapie des allergies grâce à la tolérance orale qu'elle permet d'induire, sa sécurité et sa simplicité d'administration. Dans ce cas, l'administration croissante de l'antigène par voie orale induit la capture de cet antigène par des cellules dendritiques pro-toléro-gènes au niveau de la muqueuse orale et digestive sécrétant de l'IL-10 et induisant la génération de lymphocytes T régulateurs localement et de manière systémique (Mascarell et al., 2008). Ce traitement a été mis en évidence comme efficace dans le traitement des maladies allergiques respiratoires à l'encontre des allergènes d'acariens, de pollens et de chat. Ainsi plus d'une centaine d'études cliniques ont été mises en place dès la fin des années 90

et au cours des années 2000, utilisant l'administration par voie orale d'extraits d'acariens, de pollens de bouleau, d'ambroisie, d'herbe ou d'allergènes de chat. Dans tous les cas, le traitement donne des effets positifs plus ou moins importants sur les allergies respiratoires (Malling, 2002). Il a également été mis en évidence comme un possible moyen thérapeutique contre l'allergie alimentaire. Cependant, même si dans ce cas le seuil de réactivité induite par l'allergène est diminuée, la balance risque bénéfice est encore déséquilibrée, nécessitant une amélioration de l'induction de tolérance orale via ce processus ou l'utilisation de traitements alternatifs tels que l'administration d'anti-IgE (Burks et al., 2008).

Ce type de traitement semble donc être plus ou moins efficace selon les allergènes, le type d'allergies et les individus et il apparaît qu'il doit être suivi de manière continue, sous risque de voir réapparaître les symptômes en cas d'arrêt du traitement (Marogna et al., 2007). La prévention semble donc être une voie préférable à la thérapie en soi.

4) La prévention des allergies par l'induction de tolérance orale

L'apparition de l'allergie se déroule très tôt au cours de la vie, dès les premiers contacts avec l'allergène. Au vu de l'impact majeur de l'allergie sur la vie quotidienne des enfants et du manque de traitements curatifs, il apparaît donc essentiel d'agir avant la mise en place de cette allergie et donc d'induire de la tolérance orale très tôt au cours de la vie afin d'éviter les réponses immunitaires indésirables lors du premier contact avec l'antigène. C'est dans ce contexte que l'induction de tolérance orale par l'allaitement apparaît comme un processus prometteur dans la prévention des maladies allergiques. Comme indiqué précédemment, le lait maternel joue un rôle majeur sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né. De plus, la plupart des antigènes alimentaires consommés par la mère se retrouvent dans le lait maternel (Palmer and Makrides, 2006). D'autres études ont également démontré la présence d'antigènes respiratoires dans le lait maternel (Macchiaverni et al., 2014). De nombreuses études épidémiologiques ont étudié l'impact du lait maternel sur le développement des maladies allergiques avec des résultats contradictoires. Une méta-analyse d'études prospectives (Gdalevich et al., 2001) et une revue multidisciplinaire d'études réalisées entre 1966 et 2000 (van Odijk et al., 2003) ont mis en évidence une protection contre le développement d'allergies par le lait maternel et une protection encore plus efficace dans les groupes d'enfants ayant des antécédents familiaux d'allergie. Une étude publiée récemment a confirmé ces résultats notamment dans l'asthme allergique (Dogaru et al., 2014). D'autres études ont également démontré un effet positif de l'allaitement sur le développement d'allergies mais sans effet du statut allergique de la mère (Kull et al., 2004; Scholtens et al., 2009). Enfin, d'autres études ont démontré que l'allaitement maternel n'avait pas d'effet protecteur sur le développement d'allergie (Kramer et al., 2007) et pouvait même augmenter le risque de développer une maladie allergique dans le cas d'antécédents familiaux (Sears et al., 2002). Il est important de noter que dans ces études, l'exposition à l'allergène de la mère au cours de l'allaitement n'est jamais prise en compte.

Chez la souris, des études ont démontré qu'il était possible de protéger le nouveau-né contre le développement d'allergie via le lait maternel à condition que la mère soit exposée à l'allergène au cours de l'allaitement et qu'il se retrouve dans le lait maternel afin de permettre l'induction de tolérance orale. Cependant, la présence seule de cet antigène ne suffit pas, et l'effet protecteur du lait maternel nécessite la présence de molécules immuno-modulatrices telles que le TGF- β (Verhasselt et

al., 2008), des IgG maternels complexés à cet antigène (Mosconi et al., 2010) ou encore des acides gras n-6 et n-3 (Korotkova et al., 2004). Les caractéristiques intrinsèques de l'allergène semblent également jouer un rôle essentiel puisque tous les allergènes n'induisent pas de tolérance orale lorsqu'ils sont transférés au nouveau-né : par exemple, l'antigène d'acarien induit une sensibilisation exacerbée du nouveau-né lorsqu'il est transmis au cours de l'allaitement (Macchiaverni et al., 2014).

Les variations de composition des laits maternels peuvent expliquer les différences observées dans les études sur l'effet du lait maternel sur le développement des réponses allergiques chez le nouveau-né. Parmi les autres facteurs pouvant modifier la composition du lait maternel et avoir un impact sur le développement de la tolérance orale chez le nouveau-né, l'alimentation de la mère semble jouer un rôle important (Menezes et al., 2003).

IV) La vitamine A

1) Généralités

La vitamine A est une vitamine liposoluble anti-oxydante essentielle à la croissance et au développement. Elle existe dans l'organisme sous différentes formes : le rétinol, le rétinal, l'acide rétinoïque et le rétinyl phosphate regroupés sous le nom de rétinoïdes. Ces rétinoïdes sont importants pour le maintien de divers procédés physiologiques essentiels tels que la croissance, la vision, la reproduction, l'immunité et le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales. Pour pouvoir survivre, l'organisme doit acquérir les rétinoïdes de l'alimentation afin de maintenir ces différents mécanismes, car il ne dispose pas de rétinoïdes endogènes. Ils sont obtenus à partir de deux sources majeures : sous forme de rétinyl esters dans les sources animales (foie, œufs, huile de poisson...) ou sous forme de carotènes provitamine A, précurseurs du rétinol, dans les sources végétales (carottes, brocolis...) (Goodman, 1984). Pour information, 1 UI de vitamine A = 0,3µg de rétinol ou rétinol équivalent (RE) ou encore 100g de carottes = 16700 UI = 5mg de rétinol. La carence en vitamine A est un des plus sérieux et plus étendus désordres nutritionnels notamment chez les enfants des pays en voie de développement dans lesquels elle touche environ 250 millions d'enfants et 7 millions de femmes en âge de se reproduire (West, 2002) et données de l'OMS). Bien qu'il y ait la mise en place de différents programmes visant à contrôler cette carence mondiale ces dernières années (Thorne-Lyman and Fawzi, 2011), la carence en vitamine A reste la cause sous-jacente d'environ 650 000 morts infantiles dues aux diarrhées infectieuses, à la rougeole ou encore à la malaria. Une autre étude a également démontré la présence de cette carence en vitamine A dans les populations socio-économiques faibles des pays développés, mettant ainsi en évidence la carence en vitamine A comme un véritable problème de santé publique (Duitsman, 1995). Afin de mieux comprendre l'impact majeur de la vitamine A sur la santé, je vais dans un premier temps décrire son métabolisme pour ensuite mettre en avant son effet sur la physiologie pour finalement me concentrer sur ses effets sur les réponses immunitaires.

2) Le métabolisme de la vitamine A

Au vu de leur importance sur un grand nombre de processus physiologiques et de leur unique source alimentaire, de nombreuses études se sont intéressées au métabolisme des rétinoïdes afin de déterminer (1) l'absorption intestinale et le métabolisme des rétinoïdes au niveau de la muqueuse intestinale (2) l'assimilation, le traitement et le stockage des rétinoïdes au niveau du foie où 70% des rétinoïdes de l'organisme sont stockés, (3) le métabolisme des rétinoïdes dans un grand nombre de tissus extra-hépatiques où l'assimilation des rétinoïdes est une composante essentielle de la physiologie ou de l'intégrité du tissu et (4) la génération d'acide rétinoïque dans certains tissus particuliers (voir Figure 16) (D'Ambrosio et al., 2011).

a) L'absorption intestinale et le transport

L'absorption des rétinoïdes au niveau de l'intestin se fait majoritairement au niveau de la portion proximale de l'intestin grêle et implique des événements métaboliques se déroulant à la fois au niveau de la lumière intestinale mais également au niveau des entérocytes. Au niveau de la lumière intestinale, les processus essentiels sont d'une part, la libération des rétinoïdes et des caroténoïdes de l'alimentation à partir de la nourriture ingérée et, d'autre part, leur émulsification avec les acides gras alimentaires et les acides biliaires afin de faciliter leur assimilation au niveau des entérocytes. Les rétinyl esters de l'alimentation sont hydrolysés en rétinol au niveau de la lumière intestinale afin de pouvoir y pénétrer. Ils sont ensuite ré-estérifiés puis intégrés dans des chylomicrons afin de pouvoir être transportés. Les carotènes quant à eux peuvent passer la barrière intestinale intacts puis seront métaboliser en rétinol au niveau de l'entérocyte. Le rétinol sera ensuite réduit en rétinol puis estérifié et intégré dans des chylomicrons à son tour (Blomhoff, 1994). Lorsque le rétinol pénètre à l'intérieur des entérocytes, il est immédiatement capté par une famille de protéines particulières les CRBP (Cellular Rétinol-Binding Protein) qui jouent plusieurs rôles. Elles protègent le rétinol liposoluble de l'environnement aqueux dans lequel il vient de pénétrer, le protègent également contre sa dégradation, le transfèrent aux enzymes nécessaires à son estérification et limitent le niveau de rétinol libre dans les membranes entérocytaires puisque, s'il est présent en grande quantité, il peut perturber l'intégrité et la fonction membranaire (Ong, 1994). L'estérification du rétinol est dû à deux fonctions enzymatiques distinctes : d'une part la Lécithine Rétinol Acyle Transférase (LRAT) qui catalyse la transesterification du rétinol en utilisant un groupe acyle présent sur les molécules de phosphatidylcholine de la membrane et d'autre part l'Acyl-coA Rétinol Acyle Transférase (ARAT) qui utilise un acyl-coA pour réaliser l'estérification du rétinol. 90% de l'estérification nécessaire à l'intégration des rétinyl esters dans les chylomicrons dépend des LRAT (O'Byrne et al., 2005). Les chylomicrons consistent en un agrégat de milliers de molécules de phospholipides et de triacylglycerol organisés de manière caractéristique autour des rétinyl esters ou d'autres vitamines liposolubles. Ils vont ensuite être exocités vers la circulation lymphatique puis rejoindre la circulation sanguine où ils vont subir de nombreuses transformations telles que l'hydrolyse des triacylglycerol ou l'acquisition d'apolipoprotéines afin de devenir des chylomicrons vestigiaux. (Green and Glickman, 1981). Environ 65 à 75% des rétinoïdes présents dans les chylomicrons seront ensuite assimilés au niveau du foie, alors que le reste sera assimilé par d'autres tissus périphériques.

b) Le métabolisme hépatique des rétinoïdes

Le foie est le site majeur du métabolisme et du stockage des rétinoïdes de l'organisme. Deux types de cellules hépatiques sont importantes dans ces processus : les cellules parenchymales (ou hépatocytes) et les cellules stellaires (ou HSC). Les hépatocytes comprennent 65% des cellules hépatiques et contiennent 90% de la masse protéique hépatique. Les HSC sont moins abondantes puisqu'elles représentent 6 à 8% des cellules hépatiques et contiennent seulement 1% de la masse protéique hépatique (Friedman, 2008). Les hépatocytes sont responsables de l'assimilation du rétinol dans le foie alors que les HSC jouent un rôle majeur dans le stockage des rétinoïdes. Lorsque les chylomicrons contenant les rétinoïdes arrivent à proximité du foie, ils vont pénétrer à l'intérieur du foie dans l'espace

de Disse situé entre l'épithélium et les hépatocytes. Ces chylomicrons vont ensuite être pris en charge uniquement par les hépatocytes. Une des voies privilégiées de ce mécanisme consiste en la capture des chylomicrons riches en apo-E par le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDL) et leur internalisation par endocytose. Si ce récepteur est absent, régulé négativement ou saturé, les chylomicrons peuvent être maintenus dans l'espace de Disse grâce à leur capture par les proteoglycanes héparine sulfate via l'apo-E pour être transférés au LDL lorsqu'il devient disponible (Cooper, 1997). Suite à son entrée dans l'hépatocyte, le rétinyl ester va être associé à des endosomes et subir une hydrolyse rapide grâce à différentes enzymes telles que les rétinyl ester hydrolase (REH) en majorité mais également les carboxylesterases ou les lipases (Harrison et al., 1995). Après que le rétinyl ester ait été hydrolysé en rétinol dans l'hépatocyte, il est ensuite transféré aux HSC où il est ré-estérifié et stocké dans des gouttelettes lipidiques. Ce transfert intervient à chaque fois que la consommation de rétinoïdes est suffisante ou en excès afin que les stocks de rétinoïdes puissent être mobilisés en cas de déficience en vitamine A. La caractéristique la plus particulière des HSC est la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques contenant des rétinyl esters dans leur cytoplasme. La teneur unique de ces gouttelettes lipidique en rétinyl esters, leur dépendance à la synthèse des rétinyl esters et leur réactivité au contenu en rétinoïdes de l'alimentation, en font des organelles de choix pour le stockage des rétinoïdes (Blaner et al., 2009). Lorsque les apports en rétinoïdes par l'alimentation sont insuffisants, les rétinyl esters stockés dans les gouttelettes lipidiques des HSC peuvent être mobilisés afin d'alimenter en rétinoïdes les organes qui en ont besoin. Pour cela, les rétinyl esters seront hydrolysés en rétinol qui sera alors transporté lié à la protéine de transport du rétinol (Rétinol Binding Protein, RBP) via la circulation sanguine vers les organes d'intérêt. Cette protéine est essentielle puisqu'elle permet de maintenir grâce à sa fonction de transport du rétinol, l'homéostasie des rétinoïdes au sein de tout l'organisme (Quadro et al., 1999).

c) L'assimilation des rétinoïdes par les tissus extra-hépatiques

En état de jeune, plus de 95% des rétinoïdes sont trouvés sous la forme de rétinol associé à la RBP. Le peu qui reste est sous forme de rétinyl ester associé à des lipoprotéines telles que les protéines de faible, très faible ou forte densité ou d'acide rétinoïque associé à l'albumine. La majorité du transfert des rétinoïdes en état de jeune se fait donc à partir du rétinol lié à la RBP. Bien que le transfert passif du rétinol à travers la membrane plasmique soit une possibilité, la présence d'un récepteur à la RBP paraît plus évidente. Ainsi une étude a mis en évidence un récepteur à la RBP transmembranaire particulier STRA6 présent dans la grande majorité des tissus métabolisant les rétinoïdes. Ainsi, STRA6 peut lier la RBP avec une haute affinité, les cellules transfectées avec STRA6 capturent le rétinol et encore plus si ces cellules expriment également la LRAT et la délétion de STRA6 induit un défaut de capture du rétinol (Kawaguchi et al., 2007). STRA6 permet également la sortie du rétinol lorsque les conditions le nécessitent, par exemple dans l'embryon lorsque le régime maternel est trop riche en rétinoïdes ou chez les embryons déficients pour la LRAT qui pourraient avoir une accumulation de rétinol intracellulaire à cause de leur incapacité à le métaboliser en rétinyl ester (Kim et al., 2008). STRA6 semble donc agir comme un transporteur bidirectionnel du rétinol, où la concentration intracellulaire en rétinol détermine la polarité du transport. De plus, il semble exister une synergie entre STRA6 et LRAT puisque les cellules qui expriment les deux protéines assimilent de plus grandes quantités de rétinoïdes que les cellules qui n'en expriment qu'une des deux. Ce processus indique que

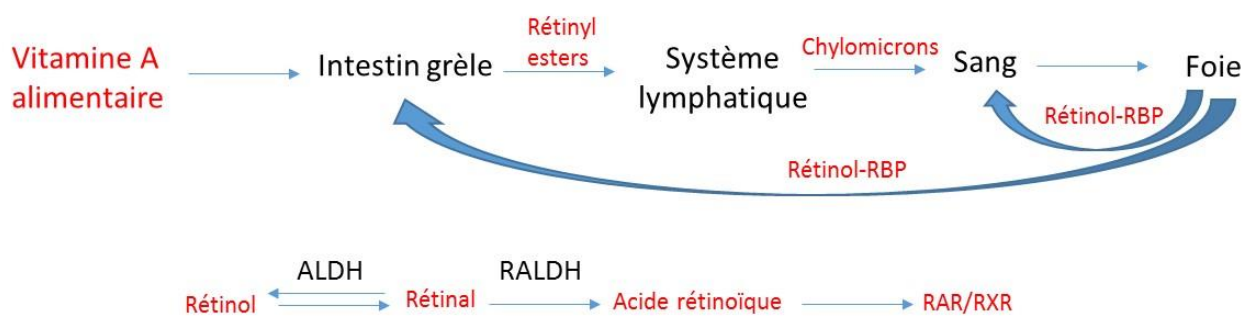
le métabolisme du rétinol en rétinyl ester par la LRAT permet d'amplifier l'entrée du rétinol via STRA6 et ainsi de catalyser l'intégration des rétinoïdes dans les tissus qui en ont besoin (Kawaguchi et al., 2007).

En phase postprandiale, comme indiqué précédemment, la plupart des rétinoïdes sont sous forme de chylomicrons. Même si 75% de ces rétinoïdes sont assimilés et stockés au niveau du foie, les 25% vont directement être absorbés par d'autres tissus tels que le tissu adipeux en majorité (15%), les muscles, le cœur, les poumons ou encore les reins (Goodman et al., 1965). L'importance des rétinyl esters dans le maintien de l'homéostasie des rétinoïdes au niveau des tissus a été mise en évidence dans les souris déficientes pour la RBP. En effet, le phénotype assez bénin de ces souris a mis en évidence l'importance des chylomicrons postprandiaux dans le maintien de l'homéostasie. Ceci fut confirmé par l'importante concentration de ces chylomicrons dans le plasma des souris mutantes. Ces souris sont également capables d'utiliser les rétinyl esters pour maintenir une embryogénèse normale (Quadro et al., 2004). Il fut également mis en évidence que l'œil était particulièrement déficient pour assimiler les rétinyl esters dérivés des chylomicrons, ce qui permet d'expliquer pourquoi la vision est particulièrement affectée chez les animaux déficients pour la RBP alors que les autres organes ne sont pas affectés grâce à leur capacité à récupérer les rétinyl esters (Vogel et al., 2002). L'enzyme essentielle à l'hydrolyse des chylomicrons et donc à l'assimilation du rétinol au niveau des organes d'intérêt est la lipoprotéine lipase. Cette lipoprotéine hydrolyse en priorité les triglycérides mais elle a également été mise en évidence comme une enzyme permettant l'hydrolyse des rétinyl esters. L'expression de cette enzyme au niveau des adipocytes permet l'assimilation du rétinol à la suite de l'hydrolyse des rétinyl esters (Blaner et al., 1994). D'autres études ont confirmé l'importance de cette protéine en la sur exprimant ou en l'inhibant notamment au niveau des muscles et du cœur, démontrant ainsi son rôle essentiel dans l'assimilation du rétinol à partir des rétinyl esters au niveau de ces organes (van Bennekum et al., 1999). Cependant, il n'y a pas d'implication de la lipoprotéine lipase au niveau des poumons et des reins, démontrant l'existence d'une autre protéine, encore non démontrée à ce jour. Les niveaux de rétinoïdes à l'intérieur des tissus restent stables. Même si l'assimilation du rétinol augmente en cas de besoin, il n'y a pas de changement quantitatif des niveaux de rétinoïdes au sein des tissus puisqu'ils ne peuvent stocker les rétinoïdes. Ainsi, les rétinoïdes assimilés sont directement utilisés et l'excès de rétinoïdes assimilé est quant à lui tout simplement relâché dans la circulation et redistribué aux autres tissus qui pourraient en avoir besoin. L'assimilation des rétinoïdes dans les tissus semble donc très finement régulée, avançant encore une fois le rôle très important des rétinoïdes dans des fonctions physiologiques essentielles.

d) La génération d'acide rétinoïque

Une fois que le rétinol est assimilé dans les tissus extra-hépatiques et après avoir pénétré à l'intérieur des cellules, l'expression de l'ALDH (alcool déshydrogénase) va induire son oxydation réversible en rétinol (voir Figure 16). Cette expression est ubiquitaire. Dans certaines cellules particulières (cellules épithéliales, dendritiques et stromales des ganglions mésentériques ; voir chapitre tolérance orale) qui expriment la RALDH (rétinaldéhyde déshydrogénase), le rétinol va être métabolisé de manière irréversible en acide rétinoïque, métabolite le plus immunologiquement actif de la vitamine A (Hall et al., 2011b). Bien que l'acide rétinoïque soit présent en quantité faible de manière basale dans le sérum,

l'expression de la RALDH est un procédé très contrôlé et est également soumis aux taux de rétinol sanguins. Les fonctions de l'acide rétinoïque dépendent de sa liaison à des récepteurs spécifiques les RAR, distribués en trois isoformes, le RAR α , RAR β et RAR γ et les RXR (Chambon, 1996).



Population cellulaire	CD103+ DC	CD103-CD11b+ DC	Cellule épithéliale	Cellule stromale
Localisation	GALT	Peau, poumon	Intestin	GALT
Enzyme	RALDH2	RALDH2	RALDH1	RALDH1,2,3
Régulation	Rétinol, acide rétinoïque, GM-CSF			Rétinol, acide rétinoïque

Figure 16: Métabolisme de la vitamine A

D'après « The role of retinoic acid in tolerance and immunity », Hall et al., Immunity, 2011

3) La vitamine A dans la physiologie

La vitamine A et ses dérivés, les rétinoïdes, sont essentiels à la fois pour le développement embryonnaire et le maintien de la différenciation des tissus à l'âge adulte. Ils jouent également un rôle majeur dans de nombreux processus physiologiques tels que la croissance, la vision ou la reproduction. Le concept de vitamine A comme un puissant agent de différenciation a émergé très tôt grâce à des études pionnières sur les effets de la déficience en vitamine A (Wolbach and Howe, 1925) puis ont ensuite été confirmés dans différents modèles cellulaires, organiques ou animaux. La régulation des fonctions somatiques par la vitamine A est aujourd'hui largement attribuée à l'acide rétinoïque, la forme la plus biologiquement active de la vitamine A, mise en évidence comme un puissant régulateur de la division cellulaire et de la différenciation dans divers tissus (Gudas, 1994). De plus, la découverte de récepteurs spécifiques de l'acide rétinoïque, les RAR et les RXR, a permis de mieux comprendre les effets que les métabolites actifs de la vitamine A, tels que l'acide rétinoïque, peuvent avoir au niveau de la régulation génique (Mangelsdorf and Evans, 1995; Pfahl and Chytil, 1996). Cependant, il est

important de garder à l'esprit que dans le cas de la vision, le rétinol est le rétinol, et non l'acide rétinol.

a) Le développement embryonnaire

Depuis très longtemps, il a été démontré qu'une déficience en vitamine A au cours de la grossesse induisait des morts fœtales ainsi que des malformations congénitales sévères (Mason, 1935). Par la suite, un grand nombre d'études, utilisant une déprivation en vitamine A de l'alimentation, ont mis en évidence un large spectre d'anomalies congénitales résultant d'une carence en vitamine A pendant la gestation (Maden et al., 1996). Les cibles majeures de la déficience en vitamine A chez l'embryon sont le tissu oculaire en grande majorité, le cœur mais également les systèmes respiratoire, circulatoire et urogénital (Wilson et al., 1953). D'autres études ont également démontré qu'en cas de déficience en vitamine A au cours de la gestation, la segmentation de l'embryon n'avait pas lieu, résultant ainsi en une absence de développement du système nerveux central (Maden et al., 1996). Dans la plupart des cas, cela résulte en une résorption très rapide de l'embryon. En cas d'apport de vitamine A ou de rétinol à différents stades de la gestation, on observe une prévention de l'apparition de ces anomalies, suggérant que la vitamine A est requise à différents stades du développement embryonnaire. Au contraire, l'apport d'acide rétinol, ne parvient pas à prévenir le développement de ces anomalies, suggérant un effet plus général des rétinoïdes dans le développement embryonnaire (Wellik and DeLuca, 1995).

Des malformations embryonnaires peuvent également survenir suite à la présence de taux excessifs de vitamine A durant le développement. La première étude établissant la tératogénicité d'un excès de vitamine A remonte également aux années 50 (Cohlan, 1954). Les cibles majeures de cet excès de vitamine A au cours de l'embryogénèse ont également été bien établies. On observe notamment des effets sur le cœur, le système nerveux central, le squelette ou les yeux (Guillonneau and Jacqz-Aigrain, 1997). Ces effets tératogènes majeurs ont ainsi donné lieu à des recommandations visant à limiter l'absorption de vitamine A au cours de la grossesse (Chan et al., 1996).

Le chevauchement des cibles à la fois de la carence et d'un excès de vitamine A au cours de l'embryogénèse démontre ainsi l'impact majeur que peuvent avoir les rétinoïdes au cours de l'organogénèse.

Une autre approche utilisée afin de confirmer ces résultats et de mieux en comprendre les causes a été l'utilisation de souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer les récepteurs aux rétinoïdes et plus spécifiquement les récepteurs à l'acide rétinol RAR et RXR (Boylan et al., 1995; Chambon, 1993). La plupart des anomalies observées chez ces souris mutantes sont les mêmes que celles observées chez les souris déficientes en vitamine A mettant ainsi en évidence le rôle majeur de l'acide rétinol dans les effets biologiques de la vitamine A, notamment au cours de l'embryogénèse (Kastner et al., 1994). L'analyse génétique et moléculaire des voies de signalisation induites par les rétinoïdes avancent des pistes importantes sur les effets pléiotropiques de la vitamine A, notamment dans l'ontogénie et sur le rôle essentiel des récepteurs à l'acide rétinol dont l'expression au cours du développement prénatal, à des stades variés de l'embryogénèse et de l'organogénèse semble indispensable (Mark et al., 2006). Ainsi, l'acide rétinol régule le développement en activant la transcription de divers gènes à des endroits variés dans l'embryon. Une cellule particulière va ainsi répondre à l'acide rétinol si elle exprime son récepteur et si le taux d'acide rétinol est approprié

à la réponse demandée. Parce que différents gènes sont connus pour être activés par différents niveaux d'acide rétinoïque (Boncinelli et al., 1991), l'efficacité de l'acide rétinoïque comme régulateur du développement nécessite un contrôle précis de sa distribution et de sa concentration.

L'impact majeur de la vitamine A sur l'embryogénèse a mis en évidence l'importance d'un apport de vitamine A constant mais contrôlé. Ceci a permis de mettre en place des instructions à suivre par les mères au cours de la grossesse. Ainsi une étude a permis de mettre en évidence que sur les femmes normalement nourries et consommant 10 000 UI de vitamine A par jour au cours de la grossesse un enfant sur 57 naît avec une malformation imputable à un excès de vitamine A (Rothman et al., 1995). Au contraire, chez les femmes déficientes en vitamine A un apport de 10 000 UI de vitamine A permet de pallier aux malformations induites par la carence en vitamine A (WHO guideline, 2011). Il apparaît donc essentiel de contrôler l'apport en vitamine A au cours de la grossesse en fonction des taux de vitamine A présents chez la mère, un taux de rétinol sanguin inférieur à 0,70 µmol/l étant considéré comme une carence (données de l'OMS).

b) La vision

Très rapidement après la découverte de la vitamine A comme un nutriment essentiel, il fut mis en évidence que l'œil en était particulièrement dépendant. Une vision nocturne déficiente est le premier signe d'une carence en vitamine A. Cette déficience réversible peut progresser en une cécité complète due à la dégénérescence des photorécepteurs. En effet, le rétinaldéhyde a été identifié comme un chromophore de la rhodopsine essentiel à la vision de la lumière (Wald, 1968). Les autres symptômes oculaires de la déficience en vitamine A incluent des défauts dus au dysfonctionnement de l'épithélium de l'œil tels que la xérophtalmie et l'ulcération de la cornée. L'effet de la déficience en vitamine A sur la vision est le plus remarquable puisqu'on estime à 5 millions le nombre d'enfants atteints de xérophtalmie (état de sécheresse avec atrophie, entraînant l'opacité de la cornée et dans certains cas une perte de la vision), faisant ainsi de la carence en vitamine A la première cause de cécité pédiatrique dans les pays émergents (Sommer, 2014). Les effets de la vitamine A sur la photo transduction sont médiés par le rétinol (Dowling and Wald, 1960). La vitamine A joue un rôle à la fois sur le développement de la rétine au cours de l'embryogénèse puis sur sa fonction au cours de la vie (Drager et al., 1998). Ainsi, la déficience en vitamine A est devenue un problème de santé publique également à cause de son implication dans la xérophtalmie et la cécité notamment chez les enfants dans le monde entier (Sommer, 1998).

c) Le tissu épithélial

La vitamine A joue un rôle important dans la différenciation du tissu épithélial. En effet, en cas de déficience en vitamine A, on observe une métaplasie, une lésion paranéoplasique qui altère les fonctions caractéristiques de l'épithélium et mène à une sensibilité accrue aux infections et à la mort (De Luca, 1991). Tous les tissus épithéliaux, incluant l'œil, la peau, la trachée, l'épithélium vaginal ou le tractus gastro-intestinal sont dépendants de la vitamine A. Des altérations du tissu épithélial

d'organes vitaux interviennent très tôt au cours de la déficience en vitamine A, suggérant un rôle essentiel de cette dernière dans la fonction de barrière de l'épithélium (McCullough et al., 1999). La corrélation entre les infections respiratoires et gastro-intestinales avec le déficit en vitamine A confirme le rôle primordial de l'intégrité intestinale dans la protection contre les infections (Ross, 1992).

d) La reproduction

La vitamine A joue un rôle important dans la reproduction à la fois chez le mâle et chez la femelle (Clagett-Dame and Knutson, 2011). La vitamine A et plus particulièrement son métabolite l'acide rétinoïque sont essentiels à la spermatogénèse. Ainsi, une déficience en vitamine A va altérer la spermatogénèse pendant la puberté et à l'âge adulte. Au contraire, un enrichissement en vitamine A va compenser cette déficience (van Pelt and de Rooij, 1990). Chez les souris déficientes en récepteur à l'acide rétinoïque, on observe une stérilité totale et une dégénération des testicules, confirmant le rôle majeur de l'acide rétinoïque dans la spermatogénèse (Lufkin et al., 1993). Chez la femelle, l'effet d'une déficience en vitamine A sur la reproduction dépend du moment où la déficience est établie ainsi que de sa sévérité (Clagett-Dame and DeLuca, 2002). Lorsque la déficience en vitamine A a lieu avant l'accouplement, l'impact majeur se fait au niveau de l'épithélium vaginal et la reproduction échoue avant l'implantation. L'ovulation a bien lieu mais les ovules dégèrent rapidement et n'atteignent pas l'étape de blastogénèse. Comme énoncé précédemment, la déficience en vitamine A impacte très fortement l'embryogénèse, mais elle a également un impact majeur sur le développement du placenta. (Noback and Takahashi, 1978), résultant en une résorption du fœtus ou des malformations majeures.

4) La vitamine A dans l'immuno-régulation

La vitamine A et plus particulièrement son métabolite principal, l'acide rétinoïque est un acteur majeur de l'immuno-régulation (Cassani et al., 2011a; Hall et al., 2011b) (voir Figure 17).

L'acide rétinoïque agit directement sur les cellules du système immunitaire. Il améliore la cytotoxicité et la prolifération des lymphocytes T grâce notamment à une augmentation de la sécrétion d'IL-2 (Ertesvag et al., 2002). Par conséquent, les souris suivant un régime déficient en vitamine A ont un défaut de réponse de leur lymphocytes T in vivo (Carman et al., 1989). L'acide rétinoïque a également un effet positif sur la différenciation des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps (Ballow et al., 1996) même si des effets contradictoires ont été observés (Lomo et al., 1998). L'acide rétinoïque peut également moduler la capacité de présentation de l'antigène en agissant directement sur les cellules dendritiques. Par exemple, en présence de stimuli pro-inflammatoires, tels que le TNF, l'acide rétinoïque augmente la maturation des cellules dendritiques et leur capacité de présentation de l'antigène (Geissmann et al., 2003)

L'acide rétinoïque peut également moduler les aspects fonctionnels de la réponse immunitaire en agissant comme cofacteur de différenciation des lymphocytes T CD4. En effet, comme démontré

précédemment, la sécrétion d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques joue un rôle essentiel dans la génération des lymphocytes T régulateurs, en association avec le TGF- β , dans la tolérance orale (voir chapitre tolérance orale). Cependant, la vitamine A semble avoir des effets pleiotropiques sur le développement des réponses immunitaires (Semba, 1998). En effet, la vitamine A et son métabolite l'acide rétinoïque ont différents effets sur la différenciation des lymphocytes T. Ainsi, une déficience en vitamine A induit un défaut dans les réponses Th1 et Th17 suite à une infection avec *Toxoplasma gondii* (Hall et al., 2011b). En association avec le TGF- β et l'IL-6, l'acide rétinoïque va amplifier les réponses de type Th17 (Mucida et al., 2007). In vitro, l'acide rétinoïque peut avoir un effet positif ou négatif sur la génération de lymphocyte Th2 en fonction de la durée d'incubation des lymphocytes T avec l'acide rétinoïque (Iwata et al., 2003). L'acide rétinoïque, en association avec l'IL-15 induit des réponses pro-inflammatoires de type Th1 suite à l'administration d'antigènes alimentaires au niveau de la muqueuse intestinale (DePaolo et al., 2011). L'acide rétinoïque induit également des marqueurs de domiciliation à l'intestin sur les lymphocytes T réalisant ainsi une étape clé dans la tolérance orale (voir chapitre sur la tolérance orale).

Enfin, la vitamine A semble également avoir un impact important sur les réponses immunitaires médiées par les cellules de l'immunité innée, dont les ILC (Innate Lymphoid Cells) de type 3. En cas de déficience en vitamine A, les ILC de type 3 sont sévèrement diminuées, résultant en une protection déficiente contre les infections bactériennes, ce qui apporte une explication supplémentaire à la sensibilité aux infections accrue des individus carencés en vitamine A. Dans le même temps, des ILC de type 2 sécrétant de l'IL-13 apparaissent. Il apparaît donc qu'en cas de carence en vitamine A, le système immunitaire inné va dévier ses réponses vers des réponses de type 2, apportant une protection plus importante contre les parasites et augmentant la sécrétion de mucus au niveau de la muqueuse intestinale, pour améliorer la barrière intestinale. Ce mécanisme d'adaptation du système immunitaire à la carence en vitamine A permet d'allonger l'espérance de vie de l'individu. (Spencer et al., 2014). De plus, les taux de rétinoïdes maternels au cours de la période fœtale semblent également avoir un impact majeur sur la présence d'un autre type d'ILC3, les LTi (lymphoid-tissue inducer), conditionnant ainsi la taille des organes lymphoïdes secondaires et l'efficacité des réponses immunitaires à l'âge adulte, notamment contre les infections (van de Pavert et al., 2014).

Au vu de l'importance majeure de la vitamine A dans l'immuno-régulation et de son impact sur les différentes réponses immunitaires, un enrichissement en vitamine A du lait maternel apparaît comme une solution à l'amélioration des réponses immunitaires du nouveau-né.

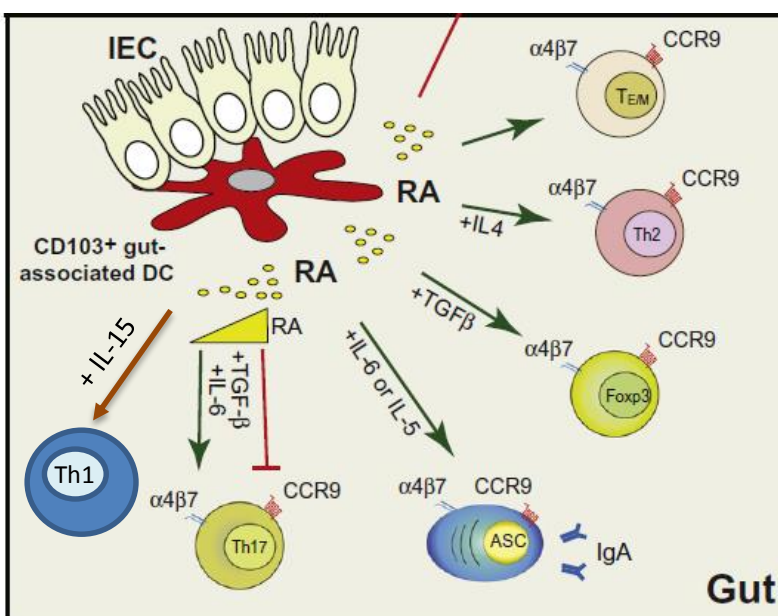


Figure 17: Rôle de l'acide rétinoïque dans l'immuno-régulation

D'après "Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance", Cassani et al., Molecular aspects of medicine, 2011

Objectifs de la thèse

La revue des thèmes abordés dans l'introduction met en évidence que les maladies allergiques sont un problème majeur de santé publique, touchant en grande majorité les enfants. L'impact de ces maladies sur la vie quotidienne et le manque de traitements curatifs font de la prévention une voie privilégiée. La tolérance orale est un mécanisme essentiel de régulation immunitaire à la fois local et systémique, qui joue un rôle majeur dans la prévention des maladies allergiques. Alors que le premier contact avec l'allergène se fait généralement en tout début de vie, très peu d'études se sont intéressées à la possibilité d'induire de la tolérance orale en période néonatale. Au vu de l'impact de l'allaitement sur le développement des réponses immunitaires du nouveau-né, nous avons choisi de déterminer la possibilité d'induire de la tolérance orale chez le nouveau-né par l'administration orale d'un allergène via l'allaitement.

L'objectif principal de mon travail de thèse a été de mettre en évidence les facteurs inhérents au début de vie qui conditionnent la prévention des maladies allergiques par induction de tolérance orale et plus particulièrement :

- (1) **Déterminer l'ontogénie de la tolérance orale en début de vie** : Au vu d'un certain nombre d'études épidémiologiques, il semble qu'il existe une période optimale d'exposition aux antigènes alimentaires comprise entre 4 et 6 mois (Fleischer et al., 2013; Muraro et al., 2014). Il apparaît ainsi essentiel de déterminer s'il existe une période plus favorable qu'une autre à l'induction de tolérance orale afin de mieux adapter l'exposition à un allergène du nouveau-né.

Je démontrerai que la période néonatale (1^{ère} semaine de vie chez la souris) n'est pas propice à l'induction de tolérance orale.

- (2) **Caractériser les acteurs de la tolérance orale en début de vie** :

- les cellules dendritiques méésentériques CD103+ ont un rôle clé dans l'induction de tolérance orale et n'ont pourtant quasiment jamais été étudiées chez le nouveau-né : Sont-elles présentes ? Sont-elles fonctionnelles ? Sécrètent-elles de l'acide rétinoïque ?

Je démontrerai un défaut de présentation de l'antigène des cellules dendritiques néonatales dû à un défaut de capture de l'antigène et un défaut de sécrétion d'acide rétinoïque par les cellules CD103+. Ces défauts sont associés à une carence en vitamine A en début de vie.

- les lymphocytes T régulateurs : l'administration par voie orale d'un antigène au cours de l'allaitement permet-il d'induire des lymphocytes T régulateurs en début de vie ? La prévention des allergies dépend-elle de la présence de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 ou le TGF- β ?

Je démontrerai que lorsque le nouveau-né reçoit l'allergène par voie orale tout au long de l'allaitement, il développe une réponse Th1 au niveau local qui le protège à l'âge adulte contre le développement d'allergies respiratoires. Contrairement à l'adulte, aucune molécule régulatrice n'est impliquée.

- (3) **Déterminer si la carence en vitamine A néonatale est à l'origine des défauts immunitaires observés chez le nouveau-né** : une supplémentation en vitamine A (précurseur de l'acide rétinoïque) permet-elle de corriger les défauts immunitaires du nouveau-né ?

Je démontrerai qu'une supplémentation en vitamine A en début de vie permet d'améliorer la fonction des cellules dendritiques du nouveau-né, résultant en une prévention des maladies allergiques via l'induction de tolérance orale dès la 1^{ère} semaine.

Résultats

I) Synthèse des résultats

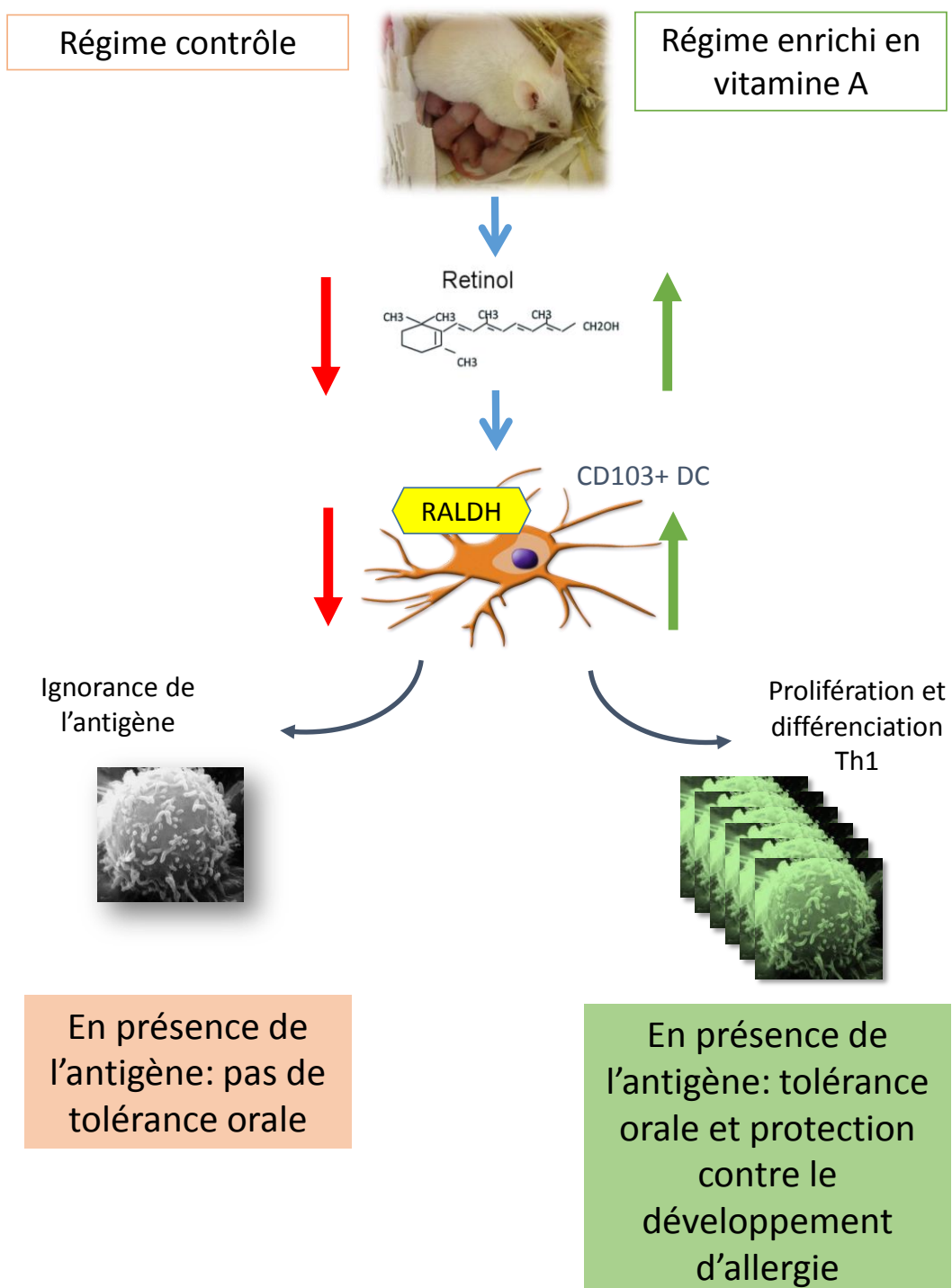
Afin de déterminer l'induction de tolérance orale en début de vie, j'ai administré aux souriceaux un allergène modèle, l'ovalbumine, via le lait maternel. Afin d'étudier l'ontogénie de la tolérance orale j'ai également administré l'allergène uniquement pendant la 1^{ère}, la 2^{ème} ou la 3^{ème} semaine d'allaitement. J'ai ensuite mis en évidence la présence de tolérance systémique chez ces mêmes souris à l'âge adulte en les soumettant à un protocole d'induction d'allergie de type respiratoire à l'encontre de l'OVA, consistant en une étape de sensibilisation puis en une exposition des voies aériennes à l'OVA, afin de concentrer la réponse allergique au niveau des voies respiratoires.

- Lorsque les souriceaux sont exposés à l'ovalbumine au cours de l'allaitement, ils sont protégés contre le développement d'allergie à l'âge adulte. Cette protection n'est pas due à l'induction de lymphocytes T régulateurs Foxp3 et ne dépend ni de l'IL-10 ni du TGF- β , mais de l'IFN- γ . L'administration par voie orale d'un antigène induit une différenciation Th1 des lymphocytes T au niveau des ganglions mésentériques qui vont induire une inhibition des maladies allergiques à distance, comme ici, au niveau des voies respiratoires. La tolérance orale mise en place en début de vie consiste donc en une différenciation de type Th1 des réponses lymphocytaires.
- Lorsque les souriceaux sont exposés à l'ovalbumine uniquement pendant la 3^{ème} semaine, ils sont protégés contre le développement d'allergie respiratoire et cette protection est comparable à celle observée lorsque les souriceaux reçoivent l'allergène durant toute la période d'allaitement. Au contraire, lorsque les souriceaux ne sont exposés à l'ovalbumine que pendant la période néonatale (1^{ère} semaine de vie), ils ne sont pas protégés contre le développement d'allergies à l'âge adulte. Afin de déterminer les raisons de cette absence de tolérance orale en début de vie, j'ai choisi d'étudier la fonction et le phénotype des cellules dendritiques mésentériques du nouveau-né. Ainsi, j'ai pu démontrer un défaut de présentation de l'antigène des cellules dendritiques néonatales aux lymphocytes T CD4, résultant en une prolifération et une différenciation Th1 diminuées. Ce défaut est associé à une capture insuffisante de l'antigène et un déficit de l'expression de la RALDH (rétinaldéhyde déshydrogénase) sur les cellules dendritiques CD103+ des ganglions mésentériques des nouveau-nés. Ceci est associé à un déficit en rétinol sanguin chez les nouveau-nés.
- Afin de déterminer si ce déficit en rétinol sanguin était bien à l'origine des défauts de réponse immunitaire observés chez le nouveau-né, j'ai administré un régime enrichi en vitamine A (rétinol) aux mères allaitantes. Grâce à ce traitement, les taux de rétinol sanguin du nouveau-né sont augmentés et l'expression de la RALDH et la capacité de capture de l'antigène des cellules dendritiques CD103+ mésentériques néonatales sont améliorées. Ceci entraîne une meilleure capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4+, résultant en une meilleure prolifération et une différenciation Th1 augmentée des lymphocytes T CD4+. Enfin lorsque les nouveau-nés reçoivent de l'ovalbumine associé à de la vitamine A dans le lait maternel au cours de la 1^{ère} semaine, ils sont protégés à l'âge adulte contre le développement d'allergies respiratoires. Cette protection est comparable à celle observée chez les souriceaux ayant reçu l'antigène au cours de la 3^{ème} semaine et dépend de la présence d'IFN- γ .

Ainsi, il apparaît que le déficit en rétinol sanguin du nouveau-né a un impact majeur sur la fonction de ses cellules dendritiques, entraînant un défaut d'induction de tolérance orale et une absence de protection contre le développement d'allergies. L'administration de vitamine A au nouveau-né permet de compenser ces défauts et permet l'induction de tolérance orale dès les premiers jours de vie.

Ces résultats ont été soumis sous la forme d'un article intitulé : **Allergy prevention by oral tolerance is inefficient in neonates due to a physiological vitamin A deficiency** à « Journal of allergy and clinical immunology », (voir ci-dessous), actuellement accepté pour révision.

➤ Schéma récapitulatif



II) Article

Allergy prevention by oral tolerance is inefficient in neonates due to a physiological vitamin A deficiency

Mathilde Turfkruyer¹, Akila Rekima¹, Patricia Macchiaverni², Meri K.Tulic^{1,3} and Valérie Verhasselt^{1,3}

Affiliations

¹Univ. Nice Sophia Antipolis, TIM, EA 6302, 06200 Nice, France

²Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³The International Inflammation 'in-FLAME' Network, Worldwide Universities Network

Corresponding author

Valérie Verhasselt,

EA 6302 "Tolérance Immunitaire"- Université de Nice Sophia-Antipolis

Hôpital de l'Archet 1- Route Saint Antoine de Ginestière - BP3079

06202 Nice Cedex 03

Phone: +33-4 92 15 77 06 Fax: +33-4 92 15 77 09

verhasselt@unice.fr

This work was supported by the Institut National de la Santé et Recherche Médicale (INSERM), Université de Nice Sophia-Antipolis (UNS), Fondation Princesse Grace, Agence Nationale de la Recherche and Fondation de recherche en santé respiratoire.

ABSTRACT

Background: Increased risk of allergic disease during early life draws attention to possible deficient immune regulation in this period of life. Oral tolerance is a key mechanism for peripheral tolerance induction and immune homeostasis. The role of deficient oral tolerance in the aetiology of increased susceptibility to allergic disease in early life has never been assessed.

Objective: To understand the mechanisms behind the establishment of oral tolerance in early life in order to better prevent allergic disease by immunomodulation.

Methods: Ovalbumin (OVA) was administered orally to mice through breast-milk during the first, second or third week of life. Efficiency of systemic tolerance to OVA was assessed in their adulthood in a model of allergic airway inflammation by intra-peritoneal antigen immunization and respiratory re-exposure to OVA. Mechanisms of oral tolerance in early life were further assessed by *in vitro* analysis of antigen presenting function of mesenteric lymph nodes cells.

Results: Oral tolerance induction in mice was not efficient until their third week of life. Inefficiency in the first 2 weeks was a consequence of defective antigen uptake and retinaldehyde dehydrogenase expression by mesenteric lymph node CD103⁺ dendritic cells which resulted in inefficient T cell activation. Retinol levels in serum of neonates were 3 times lower than in adult mice. Vitamin A supplementation in neonates increased retinol levels, corrected DC function and was sufficient to allow allergic disease prevention from birth. Finally, allergic disease prevention by oral antigen administration in vitamin A supplemented-neonates and 3 week old pups was critically dependent on IFN- γ .

Conclusion: Our data demonstrate that the increase in vitamin A levels in early life is central to increase capacity of Th1 differentiation in response to oral antigen exposure and thereby allergic disease prevention. This knowledge should guide the design of immune intervention for allergic disease prevention that is adapted and specific to early life such as vitamin A supplementation.

Key messages:

- Allergy prevention by oral tolerance induction is inefficient in neonates
- Neonates are physiologically vitamin A-deficient which impacts mesenteric CD103+ dendritic cells function and results in immune ignorance of orally administered antigen.
- Maternal vitamin A supplementation allows allergy prevention by oral antigen administration immediately after birth by a Th1-dependent mechanism.

Capsule summary:

Identification that low levels of vitamin A in well-nourished neonates compromises the efficiency of allergic disease prevention by oral antigen administration, indicates that vitamin A supplementation in early life should be considered as a promising strategy for primary prevention of allergy.

Key words:

Neonates, oral tolerance, prevention, allergy, vitamin A, dendritic cells, Th1

Abbreviations

OVA: ovalbumin

DC: Dendritic cell

MLN: mesenteric lymph node

Treg: regulatory T lymphocyte

IL: interleukin

TGF: transforming growth factor

Ig: immunoglobulin

IFN- γ : interferon- γ

SPF: specific pathogen free

PBS: phosphate buffer saline

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

RALDH: retinaldehyde deshydrogénase

APC: antigen presenting cell

MHC: major histocompatibility complex

INTRODUCTION

Neonatal immune system faces considerable challenges as it must cope with high antigenic stimulus following gut and skin microbial colonization and exposure to numerous new environmental antigens. At the same time, neonatal development of organs requires low inflammatory immune response to allow harmonious growth. In accordance to these constraints, immune system in early post-natal life functions differently from the adult one and immune responses in this period of life have been reported to be biased towards tolerogenic immune responses as demonstrated by pioneer studies of Medawar (Billingham et al., 1953) and/or Th2 immune responses (reviewed in (Adkins et al., 2004)). Most probably, this bias contributes to the higher susceptibility to infectious diseases in early life and highlights the importance of maternal help for immune defence by continuous transfer of antibodies after delivery through breast milk (Labbok et al., 2004). Early life is also characterized by higher susceptibility to allergic disease (Karlsson et al., 2004; Tulic et al., 2011; Wahn and von Mutius, 2001), which reveals an impaired capacity to generate regulatory immune responses towards innocuous dietary and environmental antigens (Akdis, 2006). This defect may reflect an impaired generation of thymic regulatory T cells (Tulic et al., 2012) and/ or impaired mechanisms of peripheral tolerance induction (Mucida et al., 2005). Oral tolerance is considered as a key mechanism for peripheral tolerance induction and more generally to play a central role in immune homeostasis (Faria and Weiner, 2005; Pabst and Mowat, 2012). It refers to the observation that regulatory mechanisms initiated towards antigen administered through oral route will prevent further inflammatory response to this antigen both in the gut and at distant site. A few studies have assessed the efficiency of oral tolerance induction in the neonate (i.e. before the third week of life) and showed it to be inefficient (Hanson, 1981; Miller et al., 1994; Strobel, 1996, 2001; Strobel and Ferguson, 1984). We have further demonstrated that maternal milk co-factors such as TGF- β or IgG are

required to induce tolerance to antigen administered orally during the first 3 weeks of life in order to prevent allergic disease (Mosconi et al., 2010; Verhasselt, 2010a, b; Verhasselt et al., 2008). These observations highlight that maternal transfer of immune mediators through breast milk is essential not only for immune defence but also for tolerance induction in early life.

The identification of mechanisms for efficient oral tolerance induction is required to improve strategies of allergic disease prevention. We previously demonstrated that upon OVA-IgG immune complexes administration through breast milk, oral tolerance relied on the induction of regulatory T lymphocytes (Tregs) expressing Foxp3 (Mosconi et al., 2010). We also assessed oral tolerance induction upon soluble OVA transfer to the neonate in the absence of maternal antigen specific IgG (Verhasselt et al., 2008). This latter model is more relevant to the human situation since IgA are the most predominant Ig class in human breast milk and the contribution of milk IgG and FcRn for the immunity of the neonate is controversial (Brandtzaeg, 2003). In addition, infants that are formula fed receive the antigen in the absence of maternal antibodies. There, we found that active immune tolerance was induced since protection was antigen specific and could be transferred; however, this was independent of FoxP3 Tregs and the precise mechanisms of protection remained unknown (Verhasselt et al., 2008). Epidemiological studies suggest that there is an optimal time window of 4 to 6 months for oral antigen exposure and prevention of allergic disease (Fleischer et al., 2013; Muraro et al., 2014) indicating the need to understand which factor may prevent oral tolerance induction in earlier life. In this context, here, we set out to uncover in a mouse model of allergic disease (1) the mechanisms of oral tolerance upon oral soluble antigen administration in early life (2) the mechanisms underlying ontogeny of efficient oral tolerance induction and (3) ways to prevent allergic disease by oral antigen administration immediately after birth. We found that allergic disease prevention by oral

antigen administration in early life was surprisingly due to Th1 lymphocytes but not classical Tregs as described in the adult and in early life upon OVA-IgG immune complexes. We further demonstrated the ineffectiveness of allergic disease prevention in the neonate by oral antigen administration and we elucidate that a physiological deficiency in vitamin A affecting neonatal dendritic cell function underlies this defect. This observation brought us to supplement neonates in vitamin A which rescued prevention of allergic disease in neonates exposed to OVA during the first week in an IFN- γ dependent manner

METHODS

Mice

Synchronous pregnant BALB/c mice were purchased from Janvier Labs (France) and housed under SPF conditions at “Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)”. Rag2 Knockout/Transgenic DO11.10 T Cell Receptor mice were obtained from Taconic (France). Experiments were performed according to the CIEPAL animal ethics agreement NCE/2012-81.

Mouse model of oral tolerance induction in early life

For oral tolerance induction in early life, we used previously published protocol (Mosconi et al., 2010; Verhasselt et al., 2008) with some modification. PBS or OVA (2mg) were given intragastrically 3 times a week to lactating mothers during the first, second or third week after delivery or during the whole lactation period. At the end of the week of OVA administration through milk, pups were separated from their mother and nursed by naive mothers until weaning. When indicated, neonates were supplemented with vitamin A by maternal administration of a vitamin A-enriched diet (250UI/g according to published data (Ross, 2010; Schuster et al., 2008), Safe, France) from 2 days before delivery until the end of the first week. Classical diet contains 4UI vitamin A/g (Safe, France). To assess efficiency of oral tolerance induction in early life, mice were submitted to a protocol of allergic airway disease as previously described (Mosconi et al., 2010; Verhasselt et al., 2008). Briefly, when 6-8 week old, female mice were immunized by 2 intra-peritoneal injections of 10 µg of OVA in 2 mg of Alum (Pierce) at 1 week interval. Ten days later, mice were exposed daily to 0.5% OVA aerosols for 5 days. Aerosol exposure was performed for 20 min using an ultrasonic nebulizer (Ultramed, Medicalia) connected to a 13000 cm³ box that served as the deposition chamber for the mice. When indicated, mice were injected with 0.5 mg of anti-CD25 mAb (PC61 clone; ATCC), 0.5mg of anti-IL10R (1B1.2 clone, DNAX research institute), 0.5mg of anti-TGF-β (1D11 clone, ATCC), 0.5 mg of anti-IFN-γ (R4-6A2 clone, ATCC) or with rat IgG1 (GL113

clone; DNAX) 1 day (5 days for PC61(Mosconi et al., 2010; Verhasselt et al., 2008)), before sensitization and challenges. Twenty-four hours after last challenge, mice were sacrificed for allergic airway disease assessment.

Assessment of allergic airway inflammation (Mosconi et al., 2010; Verhasselt et al., 2008)

- Serum OVA specific IgE quantification

Blood was obtained from mice by intra-cardiac puncture and serum was prepared by centrifugation (10,000 rpm, 10 min) using heparin-coated tubes. They were stored at -20°C until analysis. Serum was analyzed for the presence of OVA-specific IgE by ELISA. Plates were first coated with their anti-mouse IgE mAb (BD), saturated with 10 % fetal calf serum in PBS, and incubated with serial dilution of sera followed by biotin-conjugated OVA antigen. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (BD) and tetramethylbenzidine (KPL, Gaithersburg, MD) were used for detection.

- Eosinophils in BAL fluids

Mice were bled and a canula was inserted into the trachea. Lungs were washed three times with 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) and cells counted. For eosinophils quantification in BAL, cells were stained with anti-CCR3 (R & D Systems), anti-CD3 and anti-CD19 antibodies (BD) and analyzed by flow cytometry using a FACSCanto flow cytometer and FACSDiva software (BD). Eosinophils were defined as $\text{CD3}^{-}\text{CD19}^{-}\text{CCR3}^{+}$ cells.

- Lung cell cytokine secretion

Lungs were harvested and digested with collagenase I (4000UI, Gibco, France) and DNase (2000 UI, Roche, France) for 30 min at 37°C . Cell suspensions were filtered through a $70\mu\text{m}$ cell strainer and depleted of red blood cells using red blood cell lysis buffer. For each mouse, 3×10^6 lung cells were cultured for 72 hrs in medium with or without OVA ($100\mu\text{g/ml}$) in 48-

well plates. Culture medium was RPMI-1640 (Gibco) containing 10 % heat-inactivated fetal calf serum (Perbio, France), 50 μ M b-mercaptoethanol (Gibco), and penicillin/ streptomycin (Gibco). Supernatants were analyzed for IL-13 contents by ELISA using antibody pairs from R & D Systems. The lower limit of detection was 150 pg/ml.

***In vitro* T cell differentiation assay**

CD4⁺ T lymphocytes were isolated from spleen and lymph nodes single cell suspensions from adult naïve DO11.10 RAG^{-/-} mice using magnetic anti-CD4 beads and LS MACS columns according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, France). Purity was checked by flow cytometry using CD3 and K α 1-26 mAb (BD) and was always higher than 95%. The positively selected CD4 T cells were labeled with 5 μ M CFSE. MLN from pups that were 4-5 days old (1week), 11-12 days (2 weeks) or 17 days (3 weeks) old were harvested and digested with collagenase I (4000UI, Gibco, France) and DNase (2000 UI, Roche, France) for 15 min at 37 ° C. 2.5x10⁵ CD4 T cells from DO11.10 RAG^{-/-} mice were cultured together with 2.5x10⁵ of MLN cells, with or without 100 μ g/ml OVA in complete RPMI (10% FCS, 2 mM L-glutamine, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, and 100 U of penicillin and streptomycin) for 4 days. When indicated 2 μ M LE135 (Tocris, United Kingdom) was added to cell cultures. On day 4, cells were stained with anti-CD3 and K α 1-26, permeabilized and stained for Foxp3 expression (ebioscience, France). CFSE dilution and Foxp3 expression were analyzed by flow cytometry. Supernatants were analyzed for cytokine expression by ELISA. IL-5 and IFN- γ antibodies were purchased from BD biosciences and IL-17 antibodies were purchased from ebiosciences. The lower level of detection was 300 pg/ml for IL-5, 30pg/ml for IFN-g and 10 pg/ml for IL-17.

***In vivo* conversion of Foxp3 Tregs**

Foxp3⁻ CD4⁺ T lymphocytes were purified from splenocytes and lymph node cells from adult naïve DO11.10 RAG-2^{-/-} mice as described in “*in vitro* differentiation assay” paragraph and

one million cells were injected intravenously into 1-day-old BALB/c pups. OVA was given orally to pups as described in “induction of oral tolerance in early life” paragraph. Mesenteric lymph nodes were harvested 1 week after the last OVA administration and MLN cells were stained for CD3, Kjl.26 and Foxp3 expression and analyzed by flow cytometry as described in “*in vitro* differentiation assay”.

In vivo Th cell differentiation

OVA was given orally to pups as described in “induction of oral tolerance in early life” paragraph. One week after last OVA administration, MLN cells were harvested from pups and cultured with OVA (100µg/ml) during 3 days. Cells were then re-stimulated with OVA (100µg/ml), anti-CD28 mAb (BD) and with Brefeldin A (5µM, Sigma) during 5 hours. Cells were stained with anti-CD4 mAb, fixed, permeabilized using cytofix/cytoperm reagent (BD) and stained with anti-IL-5, anti-IL-10, anti- IL-17 or anti-IFN-γ mAbs (BD) and analyzed by flow cytometry.

Retinol levels in serum

Serum was harvested from pups aged 5, 12 or 17 days by intra-cardiac puncture and kept away from light and at -80° until further analyzis. Retinol levels were analyzed by high performance liquid chromatography using Reagent kit from Chromsystems in collaboration with Dr Francois Boutboul at Hopital Pasteur, Nice.

Dendritic cell phenotype

MLN single cells suspensions from pups aged 4-5, 11-12 or 17 days were stained with anti-CD11c, anti-MHCII, anti-F4/80, anti-CD11b, anti-CD103 mAbs (all from BD and eBiosciences). Macrophages were excluded from the analysis according to their expression of CD11b and F4/80. Double expression of MHCII and CD11c defined DC population which was further sub-divided by CD103 expression. CD103⁺ DC were analysed for their RALDH

enzyme activity using Stem cell protocol and reagents (Stem cell, France). A specific inhibitor of RALDH, diethylaminobenzaldehyde (DEAB), was used to control for background fluorescence.

OVA uptake

MLN from pups that were 4-5 days old (1week) or 17 days (3 weeks) old were harvested and digested with collagenase I (4000UI, Gibco, France) and DNase (2000 UI, Roche, France) for 15 min at 37 ° C. One 10^6 of MLN cells were incubated with 10 μ g/ml of OVA-alexa 488 (Life technologies, France) during 40 min at 37°C. Percentage of CD11c⁺ MHCII⁺ CD103⁺ OVA⁺ DC was assessed by flow cytometry. Culture without OVA was performed to determine fluorescence specific for OVA uptake and background fluorescence of cells pulsed at 0°C was always subtracted.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed using a two-tail p-value calculated with Mann-Whitney non-parametric test using GraphPad Prism software. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05

RESULTS

Oral tolerance induced in early life is IFN- γ dependent

We addressed mechanisms of oral tolerance induction in early life in an animal model whereby soluble OVA is given orally to mice through maternal milk during the whole lactation period (Verhasselt et al., 2008). The efficiency of oral tolerance induction to OVA was assessed in the adult in a model of allergic airway inflammation in order to determine whether immune tolerance induced in the neonate gut could affect allergic immune responses at distant sites. Eosinophilic airway inflammation (Fig 1, A), serum OVA specific IgE levels (Fig 1, B) and lung IL-13 secretion (Fig 1, C) were monitored to evaluate allergic airway inflammation. Depletion of CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs by administration of specific monoclonal antibodies at the time of antigen immunization and respiratory challenges had no effect on systemic tolerance induced by oral OVA administration during lactation period ((Verhasselt et al., 2008) and Fig 1 A, B, C). We further confirmed that Foxp3 Tregs were not involved in oral tolerance in early life since conversion of endogenous and OVA-specific T cells into Foxp3 expressing Tregs were not increased by oral OVA administration (Fig 1, D). To assess the role of IL-10 secreting Tr1 and TGF-beta secreting Th3 lymphocytes, we next neutralized IL-10 or TGF- β ; this strategy did not have neither an impact on prevention of allergic disease (Fig 1, A, B, C). Altogether, these data indicate that prevention of allergic disease by oral antigen administration in early life is not mediated by Tregs classically reported in the adult. We then assessed the role of IFN- γ in the protection observed in view of its described beneficial effect in allergic disease (Brand et al., 2012; Cohn et al., 1999; Iwamoto et al., 1993; Leonard et al., 1997; Nakagome et al., 2009). We found a significant increase of IFN- γ secretion by CD4⁺T lymphocytes from mesenteric lymph node (MLN) of mice after weaning and in their lung after OVA respiratory challenges indicating that Th1 differentiation was

induced both in the gut associated lymphoid tissue and at distant site in mice who received OVA orally during lactation period (Fig 1, E, F). Importantly, the neutralization of IFN- γ restored the allergic phenotype demonstrating that Th1 differentiation induced in mice that received OVA during early life was responsible for their protection (Fig 1, A, B ,C)..

Ontogeny of oral tolerance induction in early life

To address the question of the optimal window of oral antigen exposure for tolerance induction and allergic disease prevention, OVA was given orally to mice through maternal milk during their first, second or third week of life and the efficiency of oral tolerance induction to OVA was assessed as described above. As shown in Figure 2, oral OVA administration to pups during the third week of life resulted in profound inhibition of eosinophilic airway inflammation (Fig 2, A), serum OVA specific IgE levels (Fig 2, B) and lung IL-13 secretion (Fig 2, C) compared to mice that did not receive OVA. This protection was comparable to the one we observed upon OVA administration during the whole lactation period (Fig 1) . In contrast, OVA-induced allergic airway inflammation was only partially prevented in mice when OVA was given during their second week of life while no significant prevention was observed if given during the first week (Fig 2). These data demonstrate that allergic disease prevention by oral antigen administration is a maturing process that is not efficient at birth even when antigen is administered through physiological breast milk route.

Oral Antigen is ignored in neonates due to deficient antigen presentation by mesenteric lymph node cells

We next focus on the mechanisms of inefficient oral tolerance induction in neonates and assessed whether oral OVA administration to neonates was able to induce Th1 differentiation as observed in 3 week old mice. We found that OVA administration during the first 2 weeks of life was not able to induce *in vivo* Th1 cell differentiation (Fig 3, A); IL-5, IL-10, IL-17 were undetectable. We next assessed *in vitro* whether a defect in antigen presentation by neonatal MLN cells underlined this inability. We observed a gradual age-related increased capacity of MLN cells to drive antigen specific adult CD4⁺ T lymphocyte proliferation (Fig 3, B, C) and differentiation (Fig 3, D). Interestingly, IFN- γ secretion increased 2.5-fold when T cells were stimulated by week 3 MLN cells compared to week 1 MLN cells. IL-13 and IL-17 increased to a lesser extend (1.3 and 1.7-fold respectively) while there was a trend towards decreased Foxp3 conversion (Fig 3, E).

Decreased retinaldehyde dehydrogenase activity in neonatal MLN

CD103⁺DC

Among MLN cells, dendritic cells (DC) are key players for naive T cell activation (Merad et al., 2013) and low DC frequency in the neonatal spleen have been described as a causal factor for defective antigen presenting cell function in the neonate (Lu et al., 1979; Muthukkumar et al., 2000; Sun et al., 2003). Our analysis of MHCII⁺ CD11c⁺ DC representation among MLN cells revealed a significant decrease in their number but there was no difference in their proportion among all MLN cells in 1, 2 or 3 week old mice (Fig 4,A). The ability of MLN CD103⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ DC to metabolize vitamin A into retinoic acid as a result of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) expression, confers a critical role of this DC population in the initiation and regulation of mucosal adaptive immune response (Agace and Persson, 2012; Benson et al., 2007; Coombes et al., 2007; Hall et al., 2011b; Mucida et al.,

2007; Sun et al., 2007). When analysing the representation of CD103⁺ DC displaying RALDH activity in MLN cells from 1, 2 or 3 week old pups, we found that both number and the frequency of CD103⁺ RALDH⁺ MLN DC were significantly lower in 1 week old compared to 3 week old pups (Fig 4, B, C) and this increase paralleled their maturation of oral tolerance with age (Fig 2).

Defect in neonatal antigen presenting cells function and RALDH activity is due to physiological vitamin A insufficiency

Prolonged vitamin A deficient diet is associated with low serum retinol levels (Ross, 2010) and low RALDH expression in CD103⁺ MLN DC (Molenaar et al., 2011; Villablanca et al., 2011). We therefore measured retinol level in serum from 1 and 3 week old pups breastfed by mothers receiving a diet containing standard vitamin A levels. We found that 1 week old neonates had very low serum retinol levels ($0.29 \pm 0.05\mu\text{M}$ (mean \pm sem, n=6; Fig 5, A). These levels are significantly lower than in 3 week old pups (Fig 5, A) and are comparable to the levels found in adult mice fed with vitamin A deficient diet for a prolonged period of time (Ross, 2010). We next decided to determine whether there was a causality relation between low neonatal retinol levels on the one hand and low RALDH expression in neonatal MLN CD103⁺ DCs, deficient ability of neonatal MLN cells to stimulate T cells *in vitro* and inefficient oral tolerance in neonates on the other hand. We supplemented lactating mice with vitamin A-enriched diet (Ross, 2010; Schuster et al., 2008) to increase neonatal retinol level and we successfully augmented neonatal retinol levels to the levels found in 3 week old pups breastfed by mothers with normal diet (Fig 5, A). In vitamin A-supplemented neonates, percentage of MLN CD103⁺ DC displaying RALDH activity reached the same value as 3 week old mice (Fig 5, B, C).

Vitamin A supplementation breaks neonatal oral antigen ignorance

We further assessed whether vitamin A supplementation was sufficient to allow neonatal efficient antigen presentation and T cell differentiation. We found an increased capacity of MLN cells from vitamin A supplemented neonates to stimulate T cell proliferation and IFN- γ secretion to levels, which were comparable to the ones observed when stimulated by MLN cells from 3 week old mice (Fig 6, A, B). The role of RALDH expression in the increased antigen presentation capacity of MLN cells from neonates under vitamin A supplement was confirmed by the addition of RALDH inhibitor LE135 to culture, which completely abolished enhanced proliferation and IFN- γ secretion by MLN cells from neonates supplemented with vitamin A (Fig 6, A, B). In parallel to these *in vitro* experiments, we assessed *in vivo* if vitamin A allowed IFN- γ secretion by CD4⁺ T lymphocytes in response to oral OVA administration from first week of life. As shown in Figure 6, C, while IFN- γ was at the limit of detection in MLN CD4⁺ T lymphocytes from neonates which had received OVA during their first week, we found similar percentages of IFN- γ secreting CD4⁺ T lymphocytes in neonates supplemented with vitamin A to the 3 week old mice. *In vivo* conversion of Foxp3 Tregs was not increased by vitamin A supplementation (Supplementary Fig 1). These *in vitro* and *in vivo* experiments indicate that vitamin A supplementation in neonates increases the ability of neonatal antigen presenting cells to present OVA to lymphocytes and to induce their Th1 differentiation.

We next asked by which mechanisms neonatal antigen presenting cell function was augmented by vitamin A supplementation. MHCII and CD86 co-stimulatory molecules expression on DC are essential for naïve lymphocytes activation (Merad et al., 2013) and were shown to be increased by retinoids (Geissmann et al., 2003). However, their expression was

similar on MLN CD103⁺ DC from neonates regardless of their vitamin A supplementation (Supplementary Fig 2). We then assessed the capacity of neonatal MLN CD103⁺ DC to capture OVA as a necessary and limiting step for antigen presentation (Sallusto et al., 1995) (Fig 3, E). We found that neonatal MLN CD103⁺ DC had a poor capacity to capture OVA as compared to DC from 3 week old mice while vitamin A supplementation induced a major increase in their antigen capture capacity (Fig 7, A, B). These data indicate that deficient antigen capture is most probably a key causal factor for deficient antigen presentation by neonatal MLN cells and inability to mount tolerance towards orally administered antigen.

Vitamin A supplementation stimulates IFN- γ mediated oral tolerance in neonates

We then assessed whether vitamin A-induced increased capacity of MLN DC to capture antigen and present it to T lymphocytes would allow oral tolerance induction to OVA from first week of life. Oral OVA administration during the first week of life to mice with vitamin A supplementation inhibited allergic airway inflammation evoked by systemic immunization of adult mice to the same extent as when OVA had been given during their third week (Fig 8 A, C). However, OVA specific IgE were not significantly affected (Fig 8, B). Eventually, we determined if vitamin A-restored neonatal oral tolerance was IFN- γ dependent as observed when induced in 3 week old mice (Fig 1, B). We found that neutralization of IFN- γ totally abolished allergy prevention by oral antigen administration in neonates supplemented with vitamin A (Fig 8).

DISCUSSION

We demonstrated in this work that oral tolerance induction for allergic disease prevention is a maturing process that becomes efficient only in the third week of life. These data are critical in light of the epidemiological studies indicating that there is an optimal time window of 4 to 6 months for oral antigen exposure and prevention of allergic disease. We identified that a physiological vitamin A deficiency in neonates was the cause of their inefficient immune regulation. In particular, we found vitamin A deficiency in neonates to be responsible for oral antigen ignorance as shown by poor T cell proliferation and differentiation both *in vitro* by neonatal APC and *in vivo* upon oral OVA administration. We further demonstrated antigen ignorance to be due to a decreased expression of RALDH in neonatal CD103⁺ DC and to their deficient antigen uptake capacity. Importantly, supplementation with vitamin A during neonatal period was sufficient to turn neonatal immune responses into responses comparable to the ones observed in 3 week old mice and allowed oral tolerance induction and prevention of allergic disease from birth. Finally, the data presented here showed that, in early life, Th1 differentiation but not Foxp3⁺ and/or IL-10 or TGF- β secreting Tregs are essential for subsequent allergic disease development prevention by early oral antigen exposure.

The low vitamin A levels in neonatal mice breastfed by mother with normal diet are in agreement with previous publication in mice (Garcia et al., 2005) and, importantly also in well-nourished humans. Indeed, there are numerous reports of low vitamin A levels in serum and livers of healthy human neonates, infants and children from countries with vitamin A sufficient diet (Delvin et al., 2000; Haskell and Brown, 1999; Malvy et al., 1993; Mitchell et al., 1973; Olson et al., 1984; Pesonen et al., 2007; Shenai et al., 1981). Infants are born with low body stores of vitamin A regardless of maternal vitamin A status and in well-nourished populations the ratio of vitamin A in maternal plasma versus cord blood is 2:1 (Haskell and Brown, 1999).

While it is clearly established that gut CD103⁺ RALDH⁺ dendritic cells stimulate Foxp3 Tregs induction by vitamin A conversion into retinoic acid (Agace and Persson, 2012; Benson et al., 2007; Coombes et al., 2007; Hall et al., 2011b; Mucida et al., 2007; Sun et al., 2007), the requirement for vitamin A in prevention of immune – mediated diseases by oral tolerance has never been demonstrated. This was suggested in only one paper showing that delayed type hypersensitivity (DTH) couldn't be prevented by oral antigen administration in vitamin A-deficient adult mice (Cassani et al., 2011b). Here, we demonstrate the critical role of vitamin A in early life for oral tolerance induction and prevention of an immune-mediated disease that is known from epidemiological studies to have its origin in this period of life (Holt et al., 2005; Wahn and von Mutius, 2001). Importantly, our observations are made in a context where vitamin A deficiency is physiological and mice are healthy which contrasts with observations made in adult mice under prolonged vitamin A deficient diet whose health is severely compromised (Moore and Holmes, 1971).

Unexpectedly from *ex vivo* reports in adults, both our *ex vivo* and *in vivo* data indicated that Foxp3 Tregs are not involved in oral tolerance induced in vitamin A-supplemented neonates but Th1 cells. Moreover, Th1 cells were also necessary for allergy prevention by oral antigen administration induced in non supplemented 3 week old mice. The role of IFN- γ in oral tolerance in adult was only demonstrated twice (Kweon et al., 1998; Lee et al., 2000) while most of the studies on oral tolerance implicate Tregs cells that secrete the suppressive cytokines IL-10 and TGF-beta and/or express Foxp3 (Faria and Weiner, 2005; Pabst and Mowat, 2012). However, our data are supported by reports both in adult mice and human on protective effects of IFN- γ in allergic disease (Brand et al., 2012; Cohn et al., 1999; Iwamoto et al., 1993; Leonard et al., 1997; Nakagome et al., 2009) but also in auto-immune disease revealing a regulatory role of this cytokine (Chu et al., 2007; Chu et al., 2000; Nakajima et al., 1990). Importantly, reduced IFN- γ during early life is a consistent and central

finding in the pathogenesis of allergic disease (reviewed in (Vuillermine et al., 2009)).

Following birth, there is an up-regulation of the IFN- γ response capacity of CD4⁺ T cells in healthy children which is not observed or delayed in atopic children ((Tulic et al., 2011) and reviewed in (Holt et al., 2005)). Microbial exposure in early life has been proposed to promote such up-regulation (Roiponen et al., 2005). The data brought in this report strongly suggest that the progressive increase in vitamin A levels in early life is central for increasing capacity of Th1 differentiation in response to oral antigen exposure and thereby allergic disease prevention. They also stress that, in early life, inducing Foxp3 Tregs for allergic disease prevention shouldn't be the only biological objective and Th1 induction should be considered with interest.

Vitamin A supplementation is already advocated for prevention of early life morbidity in developing countries where supplies of vitamin A in the diet are insufficient (Sommer, 2008; Stephensen, 2001). In the context of the major increase in allergic disease risk in well-nourished western countries, we may also propose vitamin A supplementation in early life to accelerate neonatal immune system maturation and allow oral tolerance and allergic disease prevention from birth. This is supported by reports on inverse association between serum retinol concentration and allergic manifestations in children and young adults (Al Senaidy, 2009; Arora et al., 2002; Pesonen et al., 2007). In addition, in the case of allergic asthma, immune –mediated protective effect of vitamin A may be reinforced by its restrictive effect on lung smooth cells differentiation and prevention of airway hyperresponsiveness (Chen et al., 2014).

In conclusion, we have identified that, a micronutrient environment specific for the neonatal period, conditions immune system function towards oral antigen ignorance. Vitamin A supplementation in neonates is sufficient to break oral antigen ignorance and stimulates IFN- γ secretion which is a critical cytokine in this period of life for allergic disease

prevention. The identification of mechanisms underlying efficiency of induction of a key process for immune homeostasis should help prevent allergic disease in early life.

ACNOWLEDGMENTS:

We thank Dr Francois Boutboul and his team from Hopital Pasteur de Nice biochemistry department for measurement of serum vitamin A levels. We thank Véronique Corcelle and the animal facility staff for their excellent care of mice and Francis Hautem for excellent laboratory management.

REFERENCES

1. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172:603-6.
2. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:553-64.
3. Labbok MH, Clark D, Goldman AS. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:565-72.
4. Wahn U, von Mutius E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:567-74.
5. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004; 199:1679-88.
6. Tulic MK, Hodder M, Forsberg A, McCarthy S, Richman T, D'Vaz N, et al. Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:470-8 e1.
7. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:738-44.
8. Tulic MK, Andrews D, Crook ML, Charles A, Tourigny MR, Moqbel R, et al. Changes in thymic regulatory T-cell maturation from birth to puberty: Differences in atopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:199-206 e4.
9. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115:1923-33.
10. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005; 206:232-59.
11. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 2012; 5:232-9.
12. Strobel S. Neonatal oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 778:88-102.
13. Strobel S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:437-42.
14. Strobel S, Ferguson A. Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr Res* 1984; 18:588-94.
15. Hanson DG. Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. *J Immunol* 1981; 127:1518-24.
16. Miller A, Lider O, Abramsky O, Weiner HL. Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. *Eur J Immunol* 1994; 24:1026-32.
17. Mosconi E, Rekima A, Seitz-Polski B, Kanda A, Fleury S, Tissandie E, et al. Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal Immunol* 2010; 3:461-74.

18. Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, Kanda A, Fleury S, Dombrowicz D, et al. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat Med* 2008; 14:170-5.
19. Verhasselt V. Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:623-30.
20. Verhasselt V. Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunol* 2010; 3:326-33.
21. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 2003; 21:3382-8.
22. Fleischer DM, Spergel JM, Assa'ad AH, Pongracic JA. Primary prevention of allergic disease through nutritional interventions. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; 1:29-36.
23. Muraro A, Halken S, Arshad SH, Beyer K, Dubois AE, Du Toit G, et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy* 2014; 69:590-601.
24. Ross AC. Diet in vitamin A research. *Methods Mol Biol* 2010; 652:295-313.
25. Schuster GU, Kenyon NJ, Stephensen CB. Vitamin A deficiency decreases and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma. *J Immunol* 2008; 180:1834-42.
26. Cohn L, Homer RJ, Niu N, Bottomly K. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 1999; 190:1309-18.
27. Iwamoto I, Nakajima H, Endo H, Yoshida S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 177:573-6.
28. Brand S, Kesper DA, Teich R, Kilic-Niebergall E, Pinkenburg O, Bothur E, et al. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:1602-10 e6.
29. Leonard C, Tormey V, Burke C, Poulter LW. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:368-75.
30. Nakagome K, Okunishi K, Imamura M, Harada H, Matsumoto T, Tanaka R, et al. IFN-gamma attenuates antigen-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune regulatory cytokine. *J Immunol* 2009; 183:209-20.
31. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:563-604.
32. Muthukkumar S, Goldstein J, Stein KE. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. *J Immunol* 2000; 165:4803-13.
33. Sun CM, Fiette L, Tanguy M, Leclerc C, Lo-Man R. Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood* 2003; 102:585-91.
34. Lu CY, Calamai EG, Unanue ER. A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. *Nature* 1979; 282:327-9.

35. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204:1757-64.
36. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204:1775-85.
37. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317:256-60.
38. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007; 204:1765-74.
39. Agace WW, Persson EK. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol* 2012; 33:42-8.
40. Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 2011; 35:13-22.
41. Molenaar R, Knippenberg M, Goverse G, Olivier BJ, de Vos AF, O'Toole T, et al. Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A. *J Immunol* 2011; 186:1934-42.
42. Villablanca EJ, Wang S, de Calisto J, Gomes DC, Kane MA, Napoli JL, et al. MyD88 and retinoic acid signaling pathways interact to modulate gastrointestinal activities of dendritic cells. *Gastroenterology* 2011; 141:176-85.
43. Geissmann F, Revy P, Brousse N, Lepelletier Y, Folli C, Durandy A, et al. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198:623-34.
44. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995; 182:389-400.
45. Garcia AL, Ruhl R, Schweigert FJ. Retinoid concentrations in the mouse during postnatal development and after maternal vitamin A supplementation. *Ann Nutr Metab* 2005; 49:333-41.
46. Haskell MJ, Brown KH. Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4:243-57.
47. Olson JA, Gunning DB, Tilton RA. Liver concentrations of vitamin A and carotenoids, as a function of age and other parameters, of American children who died of various causes. *Am J Clin Nutr* 1984; 39:903-10.
48. Malvy DJ, Burtshy B, Dostalova L, Amedee-Manesme O. Serum retinol, beta-carotene, alpha-tocopherol and cholesterol in healthy French children. *Int J Epidemiol* 1993; 22:237-46.
49. Delvin EE, Salle BL, Reygrobellet B, Mellier G, Claris O. Vitamin A and E supplementation in breast-fed newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31:562-5.

50. Shenai JP, Chytil F, Jhaveri A, Stahlman MT. Plasma vitamin A and retinol-binding protein in premature and term neonates. *J Pediatr* 1981; 99:302-5.
51. Mitchell GV, Young M, Seward CR. Vitamin A and carotene levels of a selected population in metropolitan Washington, D. C. *Am J Clin Nutr* 1973; 26:992-7.
52. Pesonen M, Kallio MJ, Siimes MA, Ranki A. Retinol concentrations after birth are inversely associated with atopic manifestations in children and young adults. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:54-61.
53. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, et al. Gut-tropic T cells that express integrin alpha4beta7 and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology* 2011; 141:2109-18.
54. Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:16-24; quiz 5.
55. Moore T, Holmes PD. The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Lab Anim* 1971; 5:239-50.
56. Kweon MN, Fujihashi K, VanCott JL, Higuchi K, Yamamoto M, McGhee JR, et al. Lack of orally induced systemic unresponsiveness in IFN-gamma knockout mice. *J Immunol* 1998; 160:1687-93.
57. Lee HO, Miller SD, Hurst SD, Tan LJ, Cooper CJ, Barrett TA. Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T-cell migration to sites of inflammation. *Gastroenterology* 2000; 119:129-38.
58. Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2000; 192:123-8.
59. Nakajima H, Takamori H, Hiyama Y, Tsukada W. The effect of treatment with interferon-gamma on type II collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:441-5.
60. Chu CQ, Swart D, Alcorn D, Tocker J, Elkon KB. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis Rheum* 2007; 56:1145-51.
61. Vuillermin PJ, Ponsonby AL, Saffery R, Tang ML, Ellis JA, Sly P, et al. Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. *Allergy* 2009; 64:348-53.
62. Roponen M, Hyvarinen A, Hirvonen MR, Keski-Nisula L, Pekkanen J. Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1048-52.
63. Sommer A. Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview. *J Nutr* 2008; 138:1835-9.
64. Stephensen CB. Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 2001; 21:167-92.
65. Arora P, Kumar V, Batra S. Vitamin A status in children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13:223-6.

66. Al Senaidy AM. Serum vitamin A and beta-carotene levels in children with asthma. *J Asthma* 2009; 46:699-702.
67. Chen F, Marquez H, Kim YK, Qian J, Shao F, Fine A, et al. Prenatal retinoid deficiency leads to airway hyperresponsiveness in adult mice. *J Clin Invest* 2014; 124:801-11.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Mechanisms of oral tolerance induced in early life

(A, B, C) OVA was given orally during the first 3 weeks (blue bars) of life or not (white bars). The role of IL-10, TGF- β , IFN- γ or CD25⁺ Foxp3⁺ T cells in adult tolerant mice was assessed by IP administration of control mAb or specific mAb before OVA immunization and respiratory challenges. Number of eosinophils in BAL **(A)**, serum levels of OVA-specific IgE **(B)** and IL-13 cytokine secretion by lung cells **(C)** are represented. **(D)** Percentage of Foxp3⁺ cells among OVA specific K α 1-26⁺ CD4⁺ T cells and among endogenous CD4⁺ T cells in MLN of 4 week old mice injected with CD4⁺ T cells from RAG-2-deficient DO11.10 TCR transgenic mice who received OVA orally during the first 3 weeks of life (blue bars) or not (white bars). **(E)** Intracellular expression of IFN- γ in MLN CD4⁺ T cells of 4 week old mice who received OVA orally during the first 3 weeks of life (blue bars) or not (white bars) after OVA and anti-CD28 *in vitro* re-stimulation. **(F)** IFN- γ secretion by lung cells of mice who received OVA orally during the first 3 weeks of life (blue bars) or not (white bars) and after OVA immunization and respiratory challenges. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of 2 **(A, B, C, E, F)** or 3 **(D)** experiments with n = 6–8 mice per group in each experiment. A representative FACS profile of intracellular expression of IFN- γ is shown in **(E)**. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 2: Ontogeny of oral tolerance induction

(A, B, C). OVA was given orally or not (none, white bars) to mice during their 1st week (wk1, red bars), 2nd week (wk2, green bars) or 3rd week (wk3, blue bars) of life. When adult,

efficiency of tolerance induction was addressed by systemic immunization with OVA in alum followed by OVA respiratory challenges and allergic airway disease assessment. Number of eosinophils in bronchoalveolar lavage (BAL) **(A)**, serum levels of OVA-specific IgE **(B)** and IL-13 cytokine secretion by lung cells **(C)** are represented. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of 2 experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 3: Antigen ignorance in neonates due to defective antigen presenting cell function

(A) Intracellular expression of IFN- γ in MLN CD4⁺ T cells of mice who received OVA orally during the first (red bars), second (green bars) or third (blue bars) week of life after OVA and anti-CD28 *in vitro* re-stimulation. **(B,C,D,E)** MLN cells from 1 (wk1, red bar), 2 (wk2, green bar) or 3 (wk3, blue bar) week old pups were cultured in the presence of OVA with OVA specific CFSE-labeled K α 1-26⁺ CD4⁺ T cells purified from adult RAG-2-deficient DO11.10 TCR transgenic mice. **(B,C)** Analysis of CFSE dilution by flow cytometry, **(D)** IFN- γ , IL-13, IL-17 secretion in culture supernatant and **(E)** Foxp3 conversion are represented. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of 5 experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment. A representative FACS profile of CFSE dilution is shown in **(C)**. ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 4: Defective RALDH activity in neonatal MLN CD103⁺ DC

(A) Number and percentage of MHCII⁺ CD11c⁺ cells among total MLN cells. **(B, C)** The number and percentage of MHCII⁺ CD103⁺ CD11c⁺ DC displaying RALDH activity was assessed by flow cytometry using fluorescent Aldefluor ALDH substrate. A specific inhibitor of ALDH,

diethylaminobenzaldehyde (DEAB), was used to control for background fluorescence. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of 3 experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment **(A, B)**. A representative FACS profile of RALDH activity is shown in **(C)**. * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 5: Maternal vitamin A supplementation increases neonatal serum retinol levels and RALDH activity in MLN CD103⁺ DC

(A) Serum retinol levels were measured by HPLC and **(B, C)** RALDH⁺ CD103⁺ MLN DC frequency were determined as described in Fig.4, in 1 week old pups with control diet (wk1, red bars) or with vitamin A supplementation (vitA wk1, red-diagonal bars) and in 3 week old pups with control diet (wk3, blue bars). Data are expressed as mean \pm s.e.m of values obtained in 6 mice in each experimental group **(A)** and as mean \pm s.e.m. of 3 experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment **(B)**; a representative FACS profile of RALDH activity is shown in **(C)** ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 6: Increased RALDH activity in neonatal MLN CD103⁺ DC improves antigen presenting cell function and Th1 differentiation

(A, B) MLN cells from 1 week old pups with control diet (wk1, red bars) or with vitamin A supplementation (vitA wk1, red-diagonal bars) and MLN cells from 3 week old pups with control diet (wk3, blue bars) were cultured in the presence of OVA with OVA specific CFSE-labeled K β 1-26⁺ CD4⁺ T cells purified from adult RAG-2-deficient DO11.10 TCR transgenic mice. When indicated, LE135 RALDH inhibitor was added to culture of MLN cells of 1 week

old pup with vitamin A supplement (vitA wk1 + LE135, red-horizontal bars). *In vitro* antigen presenting function was assessed by analysis of CFSE dilution by flow cytometry **(A)** and IFN- γ secretion in culture supernatant **(B)**. **(C)** Intracellular expression of IFN- γ in MLN CD4⁺ T cells of 4 week old mice which received OVA alone orally during the first week of life (red bars), OVA and vitamin A during the first week of life (red-diagonal bars) or OVA alone in the third week of life (blue bars). Data are expressed as mean \pm s.e.m of 5 **(A, B)** and 2 **(C)** experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 7: Improved APC function in vitamin A-supplemented neonates is due to increased MLN CD103⁺ DC antigen uptake capacity.

(A) Antigen uptake was assessed by analyzing by flow cytometry the *in vitro* capture of fluorescent OVA-alexa 488 by MHCII⁺ CD11c⁺ CD103⁺ DC in MLN cells. Data are expressed as mean \pm s.e.m of 2 experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment; **(B)** a representative FACS profile of OVA uptake is shown in where negative control correspond to fluorescence observed in the absence of added OVA. ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 8: Vitamin A supplementation allows IFN- γ dependent oral tolerance induction in neonates

OVA was given orally during the 1st week of life of pups with control diet (wk1, red bars) or with vitamin A supplementation (vitA wk1, red-diagonal bars) and during the 3rd week of life of pups without vitamin A supplementation (wk3, blue bars). In addition, IFN- γ was neutralized by IP administration of specific mAb before OVA immunization and respiratory

challenges in mice that had received OVA during the 1st week of life of pups with control diet (wk1, red, black-horizontal bars,) or with vitamin A supplementation (vitA wk1, red-horizontal bars) and during the 3rd week of life of pups without vitamin A supplementation (wk3, blue, black-horizontal bars). Number of eosinophils in bronchoalveolar lavage (BAL) **(A)**, serum levels of OVA-specific IgE **(B)** and IL-13 cytokine secretion by lung cells **(C)** after allergic airway disease induction protocol are represented. Data are expressed as mean \pm s.e.m of 3 independent experiments with n = 6 – 8 mice per group in each experiment. *** P < 0.001; ** P < 0.01; * P < 0.05; ns P > 0.05.

Figure 1: Mechanisms of oral tolerance induced in early life

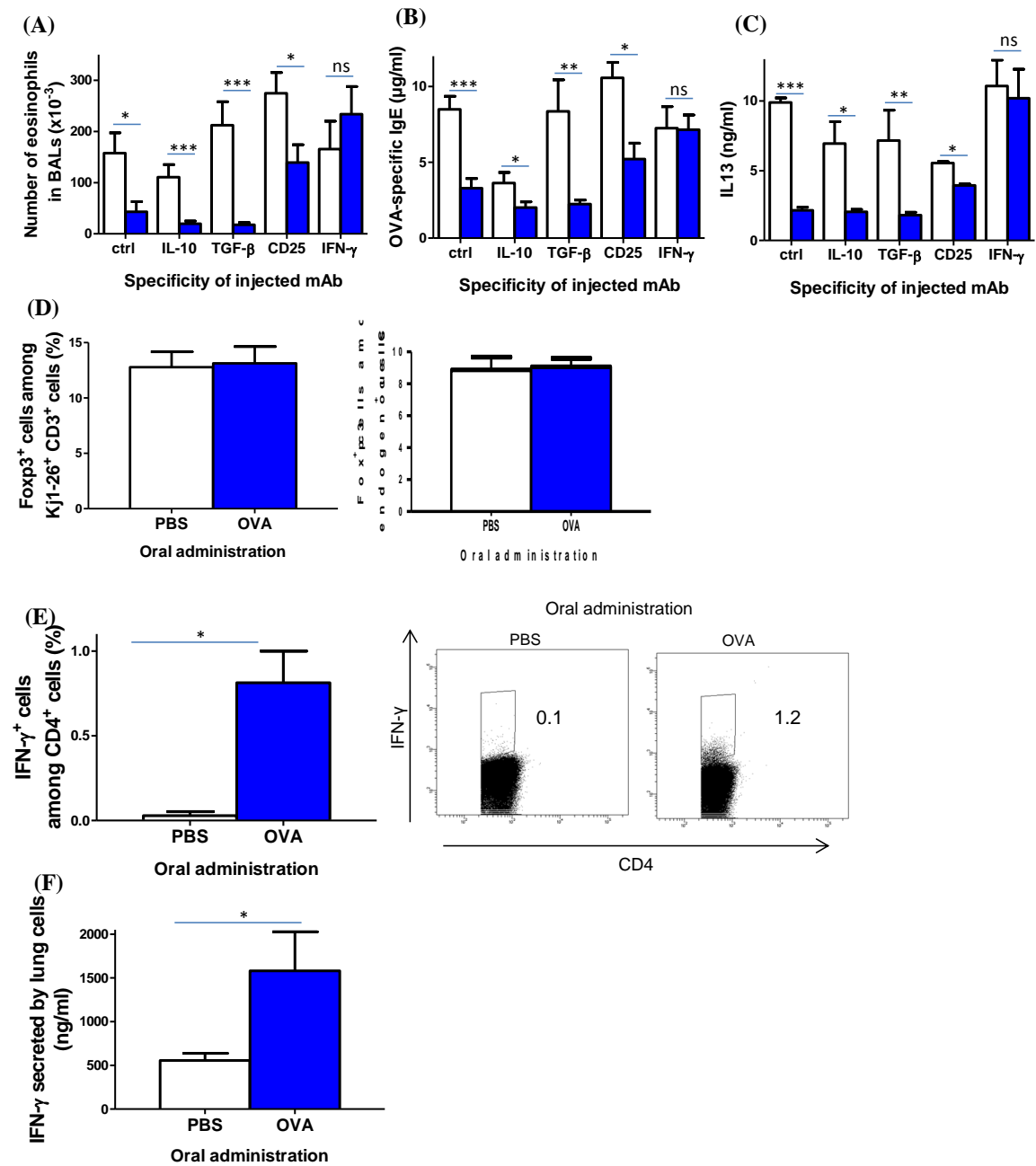


Figure 2: Ontogeny of oral tolerance induction

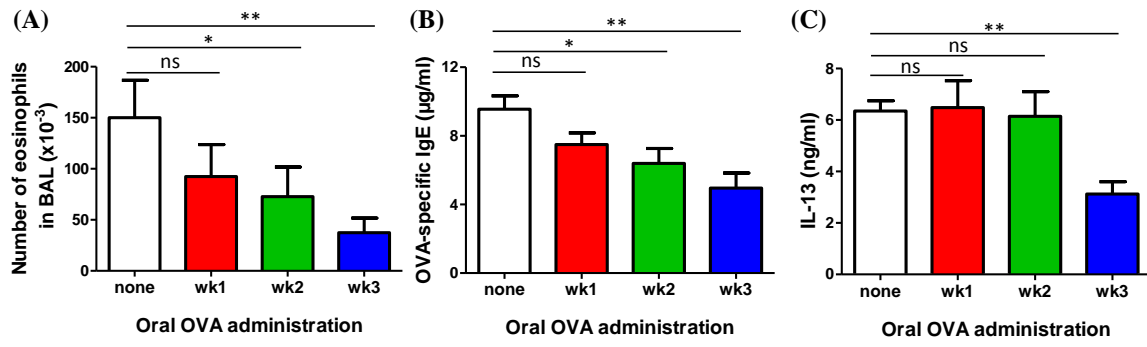


Figure 3: Antigen ignorance in neonates due to defective antigen presenting cell function

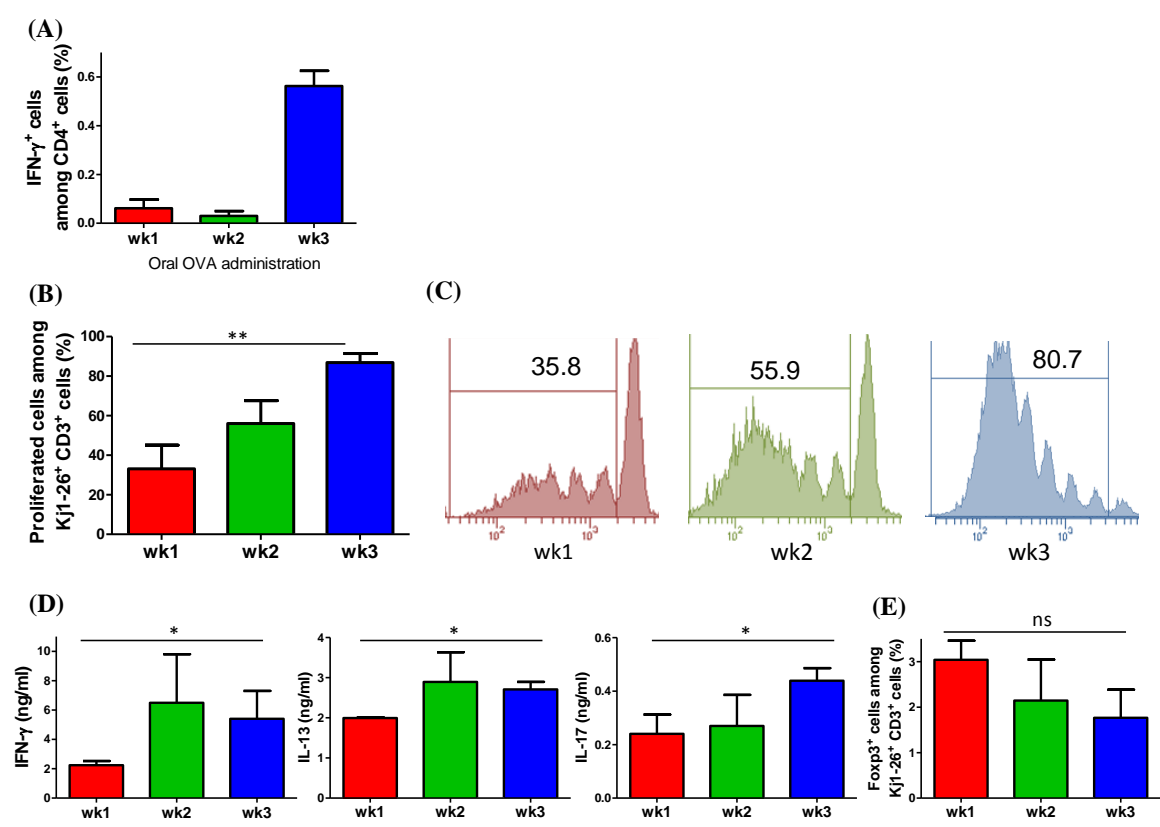


Figure 4: Defective RALDH activity in neonatal MLN CD103⁺ DC

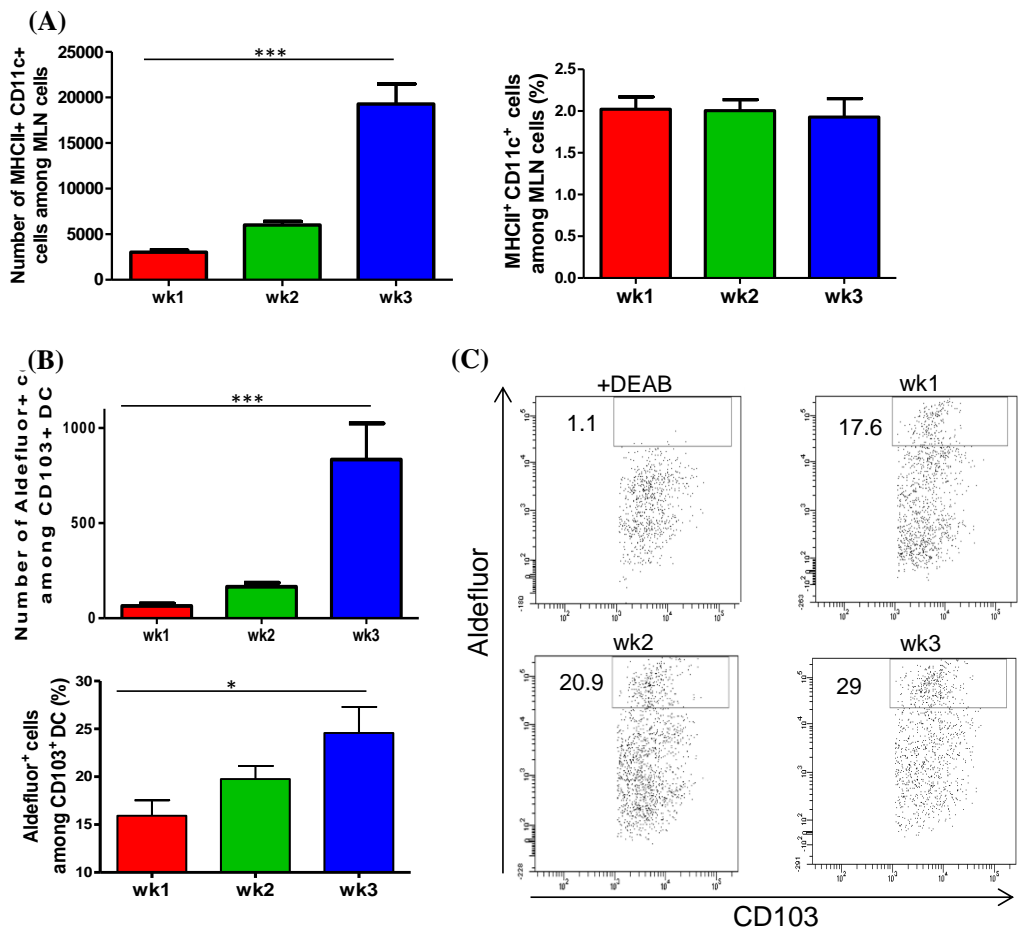


Figure 5: Maternal vitamin A supplementation increases neonatal serum retinol levels and RALDH activity in MLN CD103⁺ DC

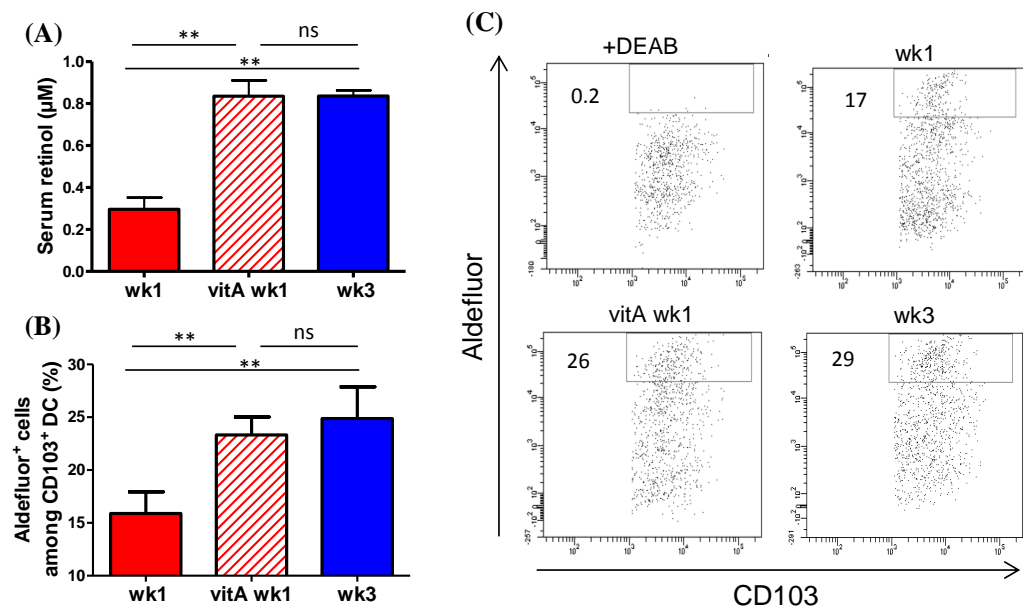


Figure 6: Increased RALDH activity in neonatal MLN CD103⁺ DC improves antigen presenting cell function and Th1 differentiation

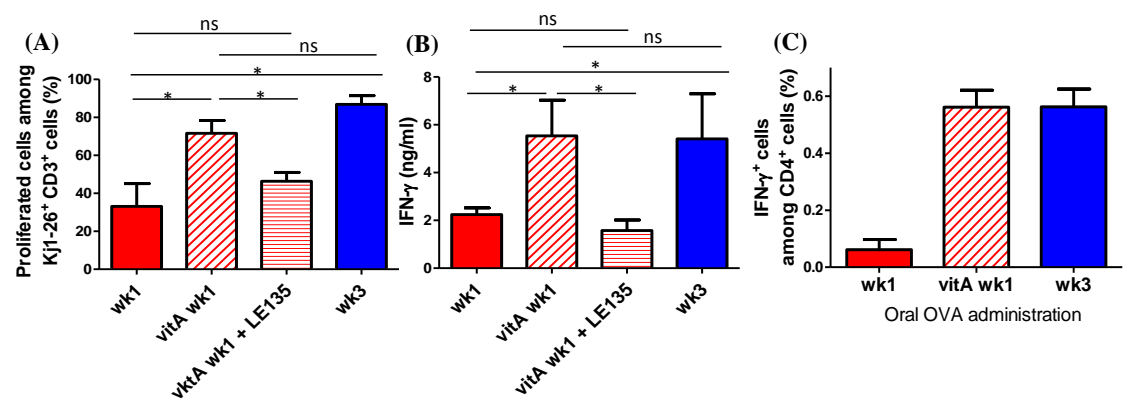


Figure 7: Improved APC function in vitamin A-supplemented neonates is due to increased MLN CD103⁺ DC antigen uptake capacity.

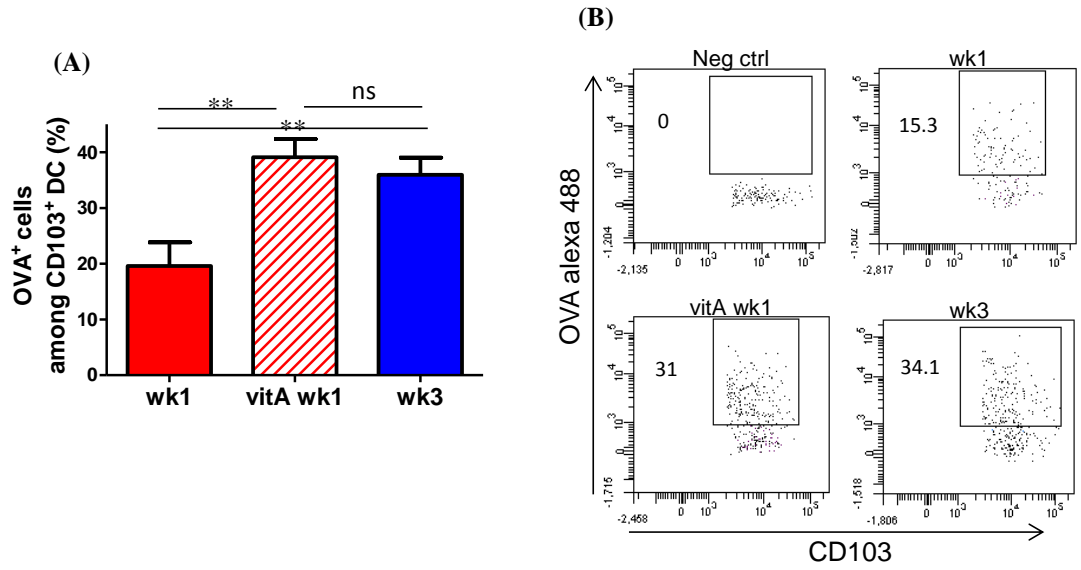
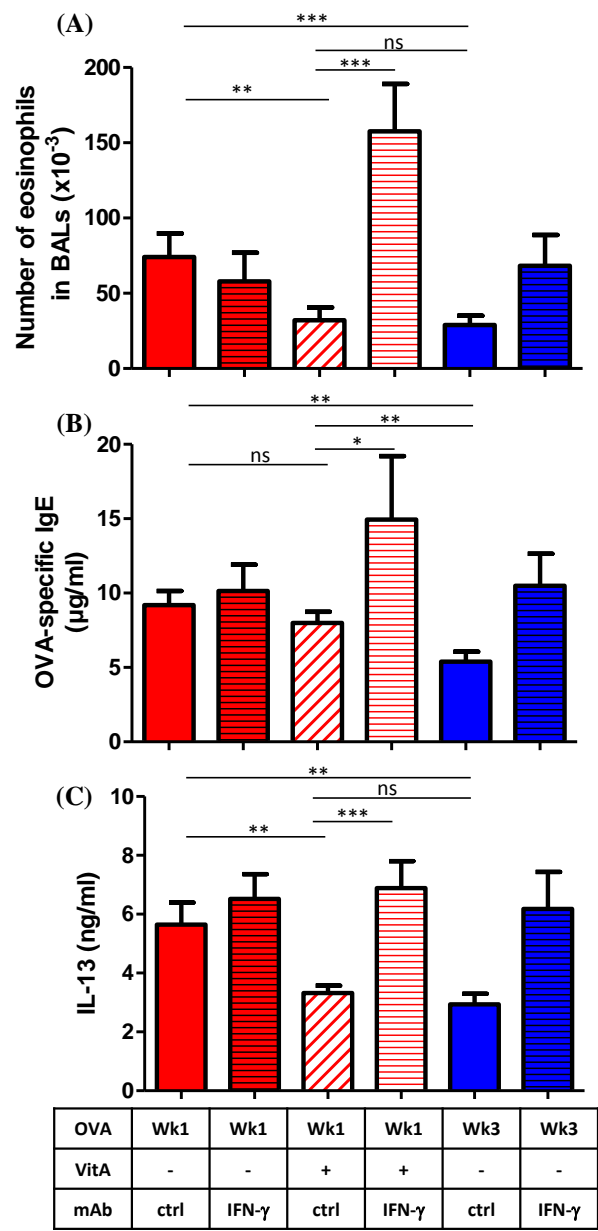
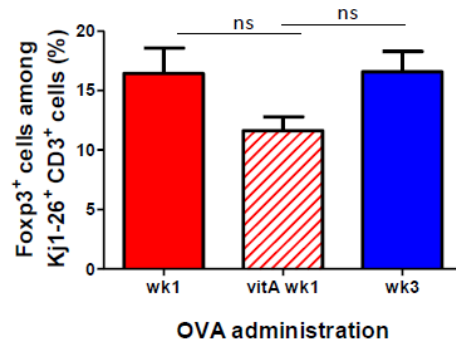


Figure 8: Vitamin A supplementation allows IFN- γ dependent oral tolerance induction in neonates



Supplementary figures

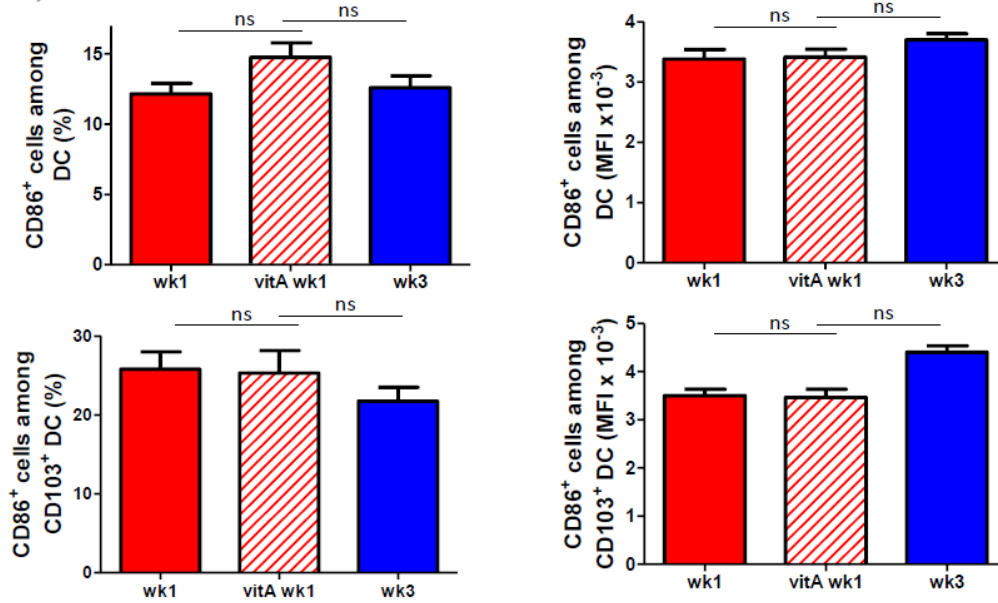
Supplementary figure 1



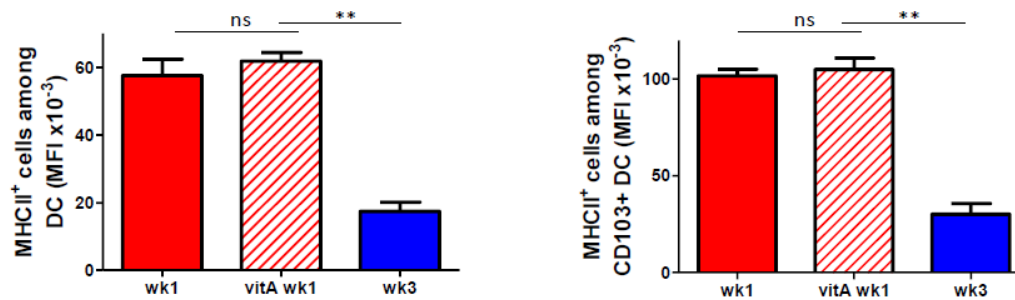
Impact of vitamin A supplementation on *in vivo* induction of Foxp3 Tregs in neonates. OVA was given orally during the 1st week with control diet (red bars) or with vitamin A supplementation (red-diagonal bars) or during the 3rd week (blue bars) of life in mice with control diet. One week after last OVA administration, the percentage of Foxp3⁺ cells among OVA specific KJ1-26⁺ CD4⁺ T cells in MLN cells of mice injected with CD4⁺ T cells from RAG-2-deficient DO11.10 TCR transgenic mice was determined. Data represent mean \pm sem of 2 independent experiments with 6-8 mice per group. ns, $P > 0.05$

Supplementary figure 2

A)



B)



CD86 expression (A) and MHC II (B) expression in MLN CD11c⁺ MHCII⁺ DC and MLN CD103⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ DC of 1 week old pups with control diet (wk1, red bars) or with vitamin A supplementation (vitA wk1, red-diagonal bars) and in 3 week old pups with control diet (wk3, blue bars). % of positive cells (A) and Mean Fluorescence Intensity (MFI) (A,B) are shown. Data are expressed as mean \pm s.e.m of 3 experiments. ** $P < 0.01$; ns $P > 0.05$

Discussion

I) Les taux de vitamine A chez le nouveau-né humain

On observe fréquemment une déficience en vitamine A en tout début de vie, que ce soit dans les pays en voie de développement comme dans les pays industrialisés. En effet, des études cliniques menées en Indonésie (Stoltzfus et al., 1993), au Brésil (Olson, 1979) ou au Bangladesh (Rice et al., 1999) démontrent que plus de 90% des enfants nés dans ces pays en voie de développement sont déficients en vitamine A. Une étude se concentrant sur les Etats-Unis a également démontré un déficit en vitamine A chez les enfants dans les pays développés : environ 30% des enfants âgés de moins de 1 mois et environ 15% des enfants entre 1 et 6 mois ont des taux de vitamine A hépatiques considérés comme déficients ($<5\mu\text{g/g}$ de foie) (Olson et al., 1984). Ainsi, même si seulement une partie de ces enfants sont considérés comme déficients, quasiment tous les enfants naissent avec des taux très bas de vitamine A hépatique, environ $20\mu\text{g/g}$. En absence d'apport de rétinol dans l'alimentation, les stocks hépatiques du nouveau-né ne lui permettraient de survivre que deux semaines (Humphrey and Rice, 2000). Les taux sériques de rétinol et de rétinol binding protein sont également très bas à la naissance, correspondant à environ la moitié des taux observés chez la mère (Shenai et al., 1981; Vahlquist et al., 1975). Pendant les 6 premiers mois de vie, les enfants sains et bien nourris vont doubler la taille de leur foie et multiplier par 5 sa concentration en vitamine A augmentant les stocks de vitamine A à $100\mu\text{g/g}$ à 6 mois, ce qui correspond à un taux comparable à l'adulte (entre 100 et $150\mu\text{g/g}$). Ceci est réalisé grâce à l'absorption de la vitamine A présente dans le lait maternel lorsque la mère est nourrie de manière équilibrée (entre 40 et $70\mu\text{g}$ de vitamine A/ dl de lait maternel) ou grâce à l'utilisation de formules de lait commerciales généralement enrichies en vitamine A (Chappell et al., 1985; Haskell and Brown, 1999). Ainsi, au cours de ses 6 premiers mois, un enfant bien nourri aura ingéré environ 85mg de vitamine A, en aura absorbé 90%, utilisé environ 60mg pour sa consommation quotidienne puis stocké le reste au niveau de son foie. Un apport basal par le lait maternel afin de remplir les conditions nécessaires au bon développement du nouveau-né est donc estimé à environ $400\mu\text{g}$ de vitamine A par jour (Olson, 1987). On estime également que dans les pays en voie de développement, l'apport en vitamine A est réduit d'au moins de moitié, rendant tout stockage hépatique impossible. Ainsi, alors que dans la plupart des pays développés, la déficience en vitamine A physiologique des nouveau-nés est compensée à partir du 6^{ème} mois, dans les pays en voie de développement, les enfants vont rester déficients en vitamine A à moins qu'une supplémentation soit effectuée afin de rétablir les stocks de vitamine A hépatique. Les taux bas en vitamine A à la naissance s'expliquent par le contrôle très régulé du passage de la vitamine A in utero. En effet, les effets majeurs des rétinoïdes sur le développement embryonnaire et fœtal font de cette régulation une étape clé. Ainsi, même lors d'une supplémentation en vitamine A au cours de la grossesse, les taux de rétinol hépatique du fœtus vont rester stables démontrant un contrôle précis du passage du rétinol à travers la barrière placentaire (Montreewasuwat and Olson, 1979). De plus, les taux de rétinol binding protein sont également très bas chez le fœtus, régulant ainsi la circulation du rétinol en période fœtale.

En conclusion, suite à la régulation précise des taux de vitamine A au cours de la grossesse, tous les nouveau-nés, même nés de mères bien nourries, naissent avec des taux bas en vitamine A, ce qui confirme les résultats que j'ai obtenus chez la souris. Un apport quotidien en vitamine A via le lait maternel est nécessaire afin de compenser ce défaut au cours des 6 premiers mois de vie. Une

supplémentation en vitamine A, déjà préconisée chez les mères déficientes en vitamine A et de manière empirique chez la plupart des mères semble donc tout à fait envisageable à condition de déterminer une dose optimale en fonction du statut de la mère allaitante.

TABLE 1
Liver vitamin A and carotenoid values as a function of age (n = 170)

Age	Type‡	n	Vitamin A*				
			Median	Mean ± SD	Range	% ≤ 5 µg/g	% ≤ 20 µg/g
0–6 day	P	46	11	16 ± 16	0–77	26	72
7–30 day	P	14	3	19 ± 44§	0–168	57	79
1 < 2 mo	P	3	3	3 ± 0.06	3	100	100
0–6 day	N	22	11	22 ± 26	0–98	27	64
7–30 day	N	7	21	23 ± 20	0–54	29	43
1 < 2 mo	N	8	13	14 ± 8	7–32	0	88
2 < 3 mo		7	15	15 ± 9	0–29	14	71
3 < 4 mo		9	43	43 ± 27	4–94	11	22
4 < 6 mo		12	47	44 ± 26	2–96	8	25
6 < 12 mo		5	103	87 ± 59	22–165	0	0
1 < 2 yr		13	65	78 ± 43	16–144	0	8
2 < 4 yr		8	130	109 ± 64	26–185	0	0
4 < 8 yr		12	120	154 ± 139	23–485	0	0
8 < 15 yr		4	124	187 ± 182	47–455	0	0

* Total vitamin A is expressed as µg retinol per g wet wt of liver.

Figure 18: Taux de vitamine A hépatiques en fonction de l'âge

D'après "Liver concentrations of vitamin A and carotenoids, as a function of age and other parameters, of American children who died of various causes", Olson et al., The American journal of clinical nutrition, 1984

II) La vitamine A dans la tolérance orale

1) Impact de la vitamine A sur les lymphocytes T régulateurs

Comme énoncé précédemment, l'acide rétinoïque, métabolite de la vitamine A, joue un rôle crucial dans la génération *in vitro* des lymphocytes T régulateurs Foxp3 au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin. Ces lymphocytes T régulateurs sont connus pour avoir une importance capitale dans l'induction de tolérance orale. Cependant très peu d'études se sont intéressées au lien direct entre la vitamine A, l'acide rétinoïque et la tolérance orale *in vivo*. Alors que de nombreuses études ont mis en évidence l'impact de l'acide rétinoïque sur la génération des lymphocytes T régulateurs *in vitro*, les résultats *in vivo* sont beaucoup plus contradictoires (Cassani et al., 2011a). La vitamine A peut agir de deux manières sur les lymphocytes T régulateurs. Elle peut participer au maintien des lymphocytes T régulateurs en conditions basales ou participer à leur induction en cas de besoin.

En conditions basales, une première étude a démontré que les taux de lymphocytes T régulateurs Foxp3 étaient les mêmes en absence ou en présence de vitamine A mais que leurs phénotypes étaient différents (Kang et al., 2009). Une autre étude a ensuite confirmé ces résultats dans la lamina propria (Cha et al., 2010). Enfin, deux autres travaux ont confirmé ces résultats mais dans le premier, les auteurs ne se sont intéressés qu'aux lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Cassani et al., 2011b) et dans le deuxième, les auteurs avancent la possibilité que le taux constant de lymphocytes T régulateurs en absence de vitamine A est dû à une prolifération excessive des lymphocytes T régulateurs naturels (Hall et al., 2011a). Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence un déficit en vitamine A en début de vie qui n'est pas non plus associé à un déficit de lymphocytes T régulateurs. En conclusion, il semblerait qu'un déficit en vitamine A n'influe pas sur la présence des lymphocytes T régulateurs en conditions basales.

Au niveau de l'induction des lymphocytes T régulateurs, les résultats sont beaucoup plus controversés. Ainsi, une première étude a démontré la possibilité d'induire des lymphocytes T régulateurs Foxp3 chez des souris soumises à un régime déficient en vitamine A et la capacité de ces lymphocytes T régulateurs à inhiber l'inflammation intestinale dans un modèle de maladie de Crohn (Kang et al., 2009). Une deuxième étude a ensuite confirmé ces résultats, mettant en évidence un défaut de génération des lymphocytes Th17 mais sans aucune altération de la génération des lymphocytes T régulateurs Foxp3 chez des souris déficientes en vitamine A (Cha et al., 2010). Cependant, une autre étude a au contraire mis en avant l'impact que pouvait avoir une déficience en vitamine A sur l'induction de lymphocytes T régulateurs Foxp3, en insistant sur le fait que les études précédentes n'avaient pas fait la distinction entre lymphocytes T régulateurs naturels et induits (Hall et al., 2011a). De même, il apparaît que l'induction de lymphocytes Tr1, sécréteurs d'IL-10 soit également insuffisante dans une souris déficiente en vitamine A. De plus, les marqueurs de domiciliation à l'intestin sont également absents de ces lymphocytes T régulateurs, or cette étape est essentielle à l'induction de tolérance orale (Cassani et al., 2011b). Enfin, alors que le RAR α (récepteur à l'acide rétinoïque) a été mis en évidence comme un facteur essentiel de la génération des lymphocytes T régulateurs Foxp3 *in vitro*, les souris déficientes en RAR α sont tout à fait capables de générer des lymphocytes T régulateurs *in vivo* (Hill et al., 2008). Dans le modèle que j'ai utilisé au cours de ma

thèse, on n'observe pas d'induction de lymphocytes T régulateurs en absence comme en présence de vitamine A. La tolérance observée en début de vie n'étant pas due à l'induction de lymphocytes T régulateurs mais à une différenciation Th1, mon travail de thèse n'apporte pas d'informations supplémentaires sur cette étape. En conclusion, le lien entre la vitamine A et son métabolite l'acide rétinoïque d'une part et l'induction de lymphocytes T régulateurs in vivo d'autre part semble beaucoup plus complexe que la génération de lymphocytes T régulateurs in vitro, mettant en avant la nécessité de l'identification d'autres facteurs nécessaires à cette étape clé de l'induction de tolérance orale.

2) La tolérance orale in vivo

L'acide rétinoïque induit la génération de lymphocytes T régulateurs ainsi que l'expression de molécules de domiciliation à l'intestin sur ces lymphocytes T (Mora, 2008). Or ces deux étapes sont essentielles pour l'induction de tolérance orale. Alors que plusieurs études ont démontré que les souris déficientes en molécules de domiciliation à l'intestin étaient incapables de mettre en place de la tolérance orale, une seule étude a mis en évidence un défaut de tolérance orale chez les souris déficientes en vitamine A (Cassani et al., 2011b). Dans cette étude, les auteurs utilisent des souris déficientes pour la LRAT (Lécithine: Rétinol Acyle Transférase), qui sont incapables de stocker le rétinol dans le foie et deviennent donc très rapidement déficientes en vitamine A, après 2 à 3 semaines de régime déficient en vitamine A. Les souris reçoivent ensuite de l'OVA par voie orale puis les réponses DTH (Delayed Type Hypersensitivity) sont mesurées. Ainsi en absence de vitamine A, l'induction de tolérance orale n'a pas lieu, résultant en une DTH plus élevée, une prolifération et une sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T augmentée et un déficit en cellules sécrétrices d'IL10. Cependant, la génération des lymphocytes T régulateurs n'est pas modifiée, confirmant le rôle controversé de l'acide rétinoïque sur la génération des lymphocytes T régulateurs in vivo. Les auteurs mettent ainsi en avant l'étape clé d'induction de molécules de domiciliation à l'intestin par l'acide rétinoïque. Dans le modèle que j'ai mis au point au cours de ma thèse, l'induction de tolérance orale est déficiente chez les nouveau-nés dont les taux de vitamine A sont physiologiquement bas. Une supplémentation en vitamine A permet de rétablir cette tolérance dès la 1^{ère} semaine, confirmant ainsi le rôle central de la vitamine A dans la tolérance orale. Or j'ai pu démontrer que l'augmentation de la sécrétion d'acide rétinoïque par les cellules dendritiques ne permettait ni d'induire des lymphocytes T régulateurs Foxp3 ni une meilleure expression du CCR9 (données non montrées). Au vu des résultats publiés par ces auteurs, il apparaît cependant nécessaire d'analyser plus en détails d'autres molécules de domiciliation à l'intestin telles que l' $\alpha 4\beta 7$, par exemple. Bien que l'acide rétinoïque semble essentiel à l'induction de tolérance orale, il a été récemment démontré qu'en présence d'IL-15, l'acide rétinoïque était également capable de jouer le rôle de cofacteur pour induire des cytokines pro-inflammatoires et des lymphocytes T effecteurs suite à l'administration par voie orale d'antigène alimentaire (DePaolo et al., 2011). Compte tenu que dans cette étude, les effets pro-Th1 et pro-Th17 de l'acide rétinoïque ont été observés chez une souris sur exprimant l'IL-15, les implications physiologiques de ces observations nécessitent d'être déterminées. Cependant, d'autres études ont confirmé l'effet de l'acide rétinoïque sur la différenciation et la domiciliation à l'intestin de lymphocytes Th17 potentiellement pro-inflammatoires (Cha et al., 2010). Ainsi, il apparaît que l'acide rétinoïque peut avoir un effet à la fois pro-inflammatoire ou tolérogénique en fonction du contexte immunologique. Au cours de ma thèse, j'ai pu démontrer que la supplémentation en vitamine A associée à une administration orale de l'antigène induisait une protection contre le développement d'allergies via un mécanisme dépendant de l'IFN- γ . Ainsi, on

pourrait supposer qu'il existe d'autres cytokines au niveau de la muqueuse intestinale qui, associées à l'acide rétinoïque, induisent une génération de lymphocytes Th1 plutôt qu'une génération de lymphocytes T régulateurs Foxp3. Ces cytokines restent encore à déterminer mais la présence d'IL-15 au niveau de la muqueuse intestinale des nouveau-nés pourrait être une piste à envisager. J'ai pu mettre en évidence au cours de ma thèse, que la présence d'IL-15 au niveau du ganglion mésentérique n'était pas essentielle à la différenciation Th1 (données non montrées). Cependant, il apparaît que la source principale de l'IL-15 est au niveau des cellules épithéliales de la barrière intestinale. D'autres études mériteraient donc d'être mises en place afin de confirmer ces résultats.

Enfin, l'effet de la vitamine A sur l'épithélium intestinal pourrait également expliquer son impact sur la tolérance orale. En effet, le défaut de tolérance orale observé en tout début de vie pourrait également être expliqué par l'immaturité de cet épithélium, et la tolérance orale améliorée pourrait être expliquée par l'activité de différenciation épithéliale connue de la vitamine A. Des études encore en cours au laboratoire ont effectivement pu démontrer que la vitamine A permettait de diminuer la perméabilité de l'épithélium intestinal et d'augmenter la présence et la taille des cryptes. Ces deux paramètres démontrent bien une maturation de l'intestin grâce à la vitamine A qui pourrait également jouer un rôle important dans l'amélioration de la tolérance orale en début de vie.

III) La vitamine A dans la prévention des maladies allergiques

La supplémentation en vitamine A a déjà été évoquée afin de réduire la morbidité et la mortalité des enfants dans les pays en voie de développement où l'apport en vitamine A est insuffisant (Sommer, 2008). Au vu de l'importance majeure des maladies allergiques dans notre société moderne, un certain nombre de recherches se sont intéressées au rôle que pourrait jouer la vitamine A et ses dérivés sur le développement des maladies allergiques. Cependant, la plupart des travaux effectués ont obtenu des résultats contradictoires. Une première étude a mis en évidence qu'une supplémentation en diverses vitamines augmente le risque d'allergies alimentaire et d'asthme allergique (Milner et al., 2004). Une deuxième analyse a mis en évidence que l'administration de vitamine A en début de vie n'avait pas d'effet sur le risque d'allergie à moins que cette vitamine A ne soit administrée dans de l'huile de cacahuète riche en oméga 3 et 6. Cette méthode semble importante à l'assimilation de la vitamine A, afin qu'elle puisse avoir un effet (Kull et al., 2006). Il a ensuite été mis en évidence qu'une supplémentation en vitamine A en tout début de vie multipliait par 3 le risque de développer une allergie alors qu'une supplémentation à 6 mois n'avait aucun effet (Kiraly et al., 2013a; Kiraly et al., 2013b).

Cependant une étude a démontré que les enfants âgés de 2 à 12 ans qui développent de l'asthme allergique ont des taux bas de vitamine A sérique. Ce faible taux de vitamine A est également corrélé à la sévérité de l'asthme allergique (Arora et al., 2002). Ces résultats ont ensuite été confirmés sur le développement d'asthme (Mizuno et al., 2006) puis une dernière étude a démontré que les enfants qui développent une maladie allergique pendant l'enfance ou l'adolescence avaient des taux plus bas de rétinol sanguin à 2 mois (Pesonen et al., 2007). Une méta-analyse des études sur la prévention des maladies allergiques par une supplémentation en vitamine A a mis en évidence une association entre le défaut de vitamine A en début de vie et le risque allergique (Nurmatov et al., 2011). Cependant, il apparaît difficile de déterminer si le défaut en vitamine A est une cause ou une conséquence des maladies allergiques.

En conclusion, il semble exister un lien étroit entre un déficit en vitamine A et un risque de développer des maladies allergiques. Cependant, il apparaît également qu'une supplémentation en vitamine A n'apporte pas d'amélioration voire même apporte une aggravation des symptômes allergiques. Ceci indique l'importance de contrôler la dose de supplémentation, afin de compenser le défaut en vitamine A observé chez les individus allergiques sans dépasser les doses optimales afin de ne pas entraîner des effets délétères.

Chez la souris, très peu de travaux ont étudié l'impact de la vitamine A sur le développement des maladies allergiques révélant également des effets contradictoires d'une supplémentation en vitamine A. Une première expérience a démontré un impact négatif de la supplémentation en vitamine A sur le développement d'allergie (Schuster et al., 2008). Cependant cette étude a été réalisée chez la souris adulte dont les taux de vitamine A sont déjà optimaux, induisant ainsi un excès de vitamine A qui en devient délétère sur le développement des allergies. Une autre analyse a également démontré qu'un enrichissement en vitamine A en période post-natale et après le sevrage induisait des réponses allergiques amplifiées suite au contact avec un allergène (Ruhl et al., 2007). Enfin, une étude a

démontré qu'une supplémentation directement en acide rétinoïque pouvait inhiber les réponses allergiques ou les amplifier en fonction de la dose administrée (Matheu et al., 2009). Une dernière expérience a confirmé les résultats positifs d'une administration d'acide rétinoïque sur l'inflammation pulmonaire induite par une maladie allergique (Wu et al., 2013). Toutes ces recherches ont cependant étudié l'impact d'une supplémentation à l'âge adulte, il apparaissait donc important d'étudier l'effet d'une supplémentation en vitamine A chez le nouveau-né dans un modèle de souris afin de pouvoir étudier son impact sur les maladies allergiques et en étudier les mécanismes. Lors de ma thèse j'ai pu mettre en évidence qu'une supplémentation en vitamine A au cours de l'allaitement permettait d'augmenter les taux de rétinol sanguin à des taux comparables à ceux observés chez l'adulte. Ces taux restent ainsi dans des niveaux contrôlés. Cette supplémentation en vitamine A associée à une induction de tolérance orale permet de protéger les souris à l'âge adulte contre le développement d'allergies. Cependant, afin de pouvoir étudier les mécanismes immunologiques impliqués dans l'induction de tolérance orale, j'ai choisi d'utiliser un modèle d'allergie respiratoire à l'encontre de l'OVA. Au vu des connaissances récentes sur les allergènes respiratoires tels que les acariens, dont la présence dans le lait maternel ne semble pas pouvoir induire de la tolérance orale en début de vie (Macchiaverni et al., 2014), il semble important de confirmer ces résultats dans un modèle d'allergie à l'encontre des acariens. De même, compte tenu de l'impact majeur d'une supplémentation en vitamine A sur l'induction de tolérance orale, il serait intéressant de déterminer l'implication de la vitamine A dans le développement des maladies allergiques alimentaires. Ces deux études sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire.

IV) Les spécificités des cellules dendritiques néonatales

Quelques études se sont consacrées à l'étude du phénotype et du fonctionnement des cellules dendritiques du nouveau-né (voir introduction). Pourtant au vu de son action majeure dans l'initiation des réponses immunitaires, la cellule dendritique nécessite d'être étudiée plus en détails. Je vais dans ce chapitre présenter les connaissances que j'ai obtenues au cours de ma thèse, afin de mettre en évidence les informations supplémentaires qu'elle apporte, de manière contradictoire ou non. Les études précédentes ont mis en évidence que les cellules dendritiques néonatales étaient capables de s'activer de manière non spécifique à l'antigène (suite à une stimulation au LPS ou au CpG) dans des conditions comparables à celles de l'adulte. Ainsi leur expression du CMH II et des molécules de co-stimulation reste assez stable au cours de l'ontogénie. Au cours de ma thèse, j'ai également confirmé que l'expression de ces marqueurs était comparable entre le nouveau-né et l'adulte.

Au niveau de la capacité de présentation, les résultats sont plus contradictoires. Une première étude a démontré que les cellules dendritiques néonatales étaient capables d'induire une réponse CD8 à l'encontre du peptide du LCMV *in vitro* et *in vivo*. Cependant, lorsque ce peptide est couplé à un antigène entier, l'activation des lymphocytes T CD8+ par les cellules dendritiques néonatales est de 3 à 5 fois moins efficace que celle observée avec les cellules dendritiques adultes (Dadaglio et al., 2002). Une autre étude a également démontré que la capacité à induire une réponse CD8 était déficiente en présence de l'antigène entier, l'ovalbumine, mais possible en présence du peptide (Kollmann et al., 2004). Enfin, une dernière étude a mis en évidence un défaut de présentation de l'antigène d'ovalbumine aux lymphocytes T CD4+ spécifiques de cet antigène (Dakic et al., 2004). La possibilité d'induire une réponse immunitaire avec un peptide mais pas avec un antigène ainsi que l'expression du CMH II comparable à l'adulte met en évidence un défaut de la capture et de l'apprêtement de l'antigène par les cellules dendritiques. Au cours de ma thèse j'ai également pu mettre en évidence un défaut de présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4+ spécifiques de cet antigène, non lié à un défaut d'expression du CMH II ou des molécules co-stimulatrices mais résultant d'un défaut de capture de l'antigène des cellules dendritiques totales et plus particulièrement des cellules dendritiques CD103+, connues pour être au centre des réponses immunitaires au niveau des ganglions mésentériques.

Bien qu'un certain nombre d'études aient mis en évidence un phénotype particulier et immature des cellules dendritiques néonatales (pas d'expression de CD4 ni de CD8, expression de CD205, fort pourcentage de cellules dendritiques plasmacytoides...), une seule étude s'est intéressée aux cellules dendritiques CD103+ (Lantier et al., 2013) et aucune n'a analysé leur fonction ni leur sécrétion d'acide rétinoïque. Or ce mécanisme est essentiel à la génération de la tolérance orale mais est également impliqué dans la différenciation des lymphocytes T. Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence un défaut d'expression de la RALDH sur les cellules dendritiques CD103+ néonatales. Cette expression est directement liée aux taux de rétinol sanguin du nouveau-né, que j'ai pu mettre en évidence comme très faibles chez le nouveau-né. De plus l'expression de cette enzyme semble bien être au centre de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T puisque lorsque cette expression augmente, la capacité des cellules dendritiques néonatales à capturer l'antigène augmente également ainsi que la

capacité à induire l'activation des lymphocytes T CD4+. Ces résultats sont également confirmés par le fait que lorsqu'un inhibiteur de la RALDH est utilisé, la capacité à induire une réponse immunitaire est diminuée.

Ces résultats apportent de nouvelles connaissances essentielles sur une sous-population de cellules dendritiques au centre des réponses immunitaires au niveau du tissu lymphoïde associé à l'intestin. Cette nouvelle compréhension des spécificités des cellules dendritiques néonatales permet d'appréhender de nouvelles voies d'études afin de mieux comprendre les réponses immunitaires inadaptées du nouveau-né et d'agir en conséquence.

V) La différenciation Th1 induite par l'administration orale d'un antigène en début de vie

1) L'IFN- γ dans la tolérance orale

Chez l'adulte, il a été mis en évidence que l'administration par voie orale d'un antigène permettait d'induire une tolérance locale et systémique reposant sur l'induction de lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T régulateurs Foxp3⁺, l'IL-10 et le TGF- β semblent être les acteurs privilégiés de la tolérance orale, en fonction de l'antigène et du modèle considéré (Faria and Weiner, 2005). Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence qu'une administration par voie orale d'un antigène libre au cours de l'allaitement n'induisait pas de lymphocytes T régulateurs Foxp3 alors qu'une protection active était observée. Cette protection n'est pas non plus dépendante de l'IL-10 ni du TGF- β mais dépend par contre de la présence d'IFN- γ .

Le rôle de l'IFN- γ dans la tolérance orale a été avancé par quelques publications mais son importance semble être controversée. Une première étude a démontré que l'administration par voie orale d'une dose importante d'un antigène classique (OVA) induisait une tolérance orale et une sécrétion augmentée d'IFN- γ par les lymphocytes T. Lorsque le même protocole est appliqué à des souris déficientes pour l'IFN- γ , cette tolérance orale n'est pas observée, démontrant un rôle central de l'IFN- γ dans la tolérance orale (Kweon et al., 1998). Cependant, une autre analyse publiée très peu de temps après a mis en évidence que ni l'IFN- γ , ni l'IL-12 n'étaient impliqués dans l'induction de tolérance orale lorsque la souris recevait plusieurs doses de ce même antigène par voie orale, même si cette administration par voie orale induisait une sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T (Mowat et al., 1999). Cependant, les auteurs ne sont pas parvenus à concilier leurs résultats avec ceux obtenus dans l'étude de Kweon et al. Une troisième étude a permis d'apporter de nouvelles informations sur ce processus en indiquant que l'IFN- γ était bien essentiel à l'induction de tolérance orale mais principalement lors l'étape d'induction de tolérance via l'administration par voie orale de l'antigène. La sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T présents au niveau des ganglions mésentériques, suite à l'administration par voie orale d'un antigène, semble empêcher la migration des lymphocytes T effecteurs en périphérie, inhibant ainsi les réponses immunitaires délétères aux sites d'inflammation (Lee et al., 2000). L'implication de l'IFN- γ dans la tolérance orale a ensuite été mise de côté suite à la découverte des lymphocytes T régulateurs Foxp3 et de leur implication majeure dans la tolérance orale. Cependant, grâce au travail effectué au cours de ma thèse, il apparaît que l'IFN- γ joue un rôle central dans la tolérance orale induite en début de vie, contrairement aux lymphocytes T régulateurs qui ne sont pas impliqués. En effet, l'administration par voie orale d'un antigène permet d'induire une sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T présents au niveau des MLN et résulte en une tolérance systémique, responsable de l'inhibition de réponses allergiques respiratoires, qui dépend de la présence de l'IFN- γ .

2) L'IFN- γ dans l'allergie

Même si le rôle de l'IFN- γ dans la tolérance orale n'est pas couramment décrit, le rôle protecteur de l'IFN- γ dans les maladies allergiques a, lui, bien été démontré. La première étude publiée sur ce sujet a permis de mettre en évidence que lors d'une injection d'IFN- γ , l'éosinophilie et le recrutement de lymphocytes Th2 était inhibés au niveau de la trachée au cours de l'induction d'une maladie allergique respiratoire (Iwamoto et al., 1993). Ces résultats ont ensuite été confirmés grâce au transfert concomitant de lymphocytes Th2 (responsables de la pathogénèse de l'allergie) et de lymphocytes Th1 résultant en une diminution de l'éosinophilie et de la production de mucus chez ces souris lors de l'induction d'une maladie allergique respiratoire (Cohn et al., 1999). Une autre étude a enfin confirmé ces résultats en démontrant que l'action de l'IFN- γ au niveau de l'épithélium respiratoire uniquement permettait de réduire l'inflammation allergique observée au niveau des voies respiratoires (Mitchell et al., 2011). Très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de cette régulation par l'IFN- γ . Une étude publiée en 2009 a mis en évidence que l'IFN- γ réduisait les réponses allergiques (sécrétion de cytokines Th2, éosinophilie et sécrétion de mucus) non pas par la génération de lymphocytes T régulateurs ou l'apoptose des cellules impliquées mais en agissant directement sur les cellules dendritiques. En effet, l'IFN- γ inhibe la capacité de présentation, de sécrétion de cytokines et de migration des cellules dendritiques, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4⁺ (Nakagome et al., 2009). Enfin, une nouvelle voie d'analyse du rôle de l'IFN- γ dans les maladies allergiques a été d'étudier l'épigénétique. En effet, les auteurs ont observé au cours de l'induction d'une maladie allergique respiratoire une méthylation du locus de l'IFN- γ , entraînant une diminution de sa sécrétion. Le traitement via un inhibiteur de DNA méthyl transférase permet de réduire la méthylation de ce locus et améliore le statut allergique des animaux (Brand et al., 2012). L'IFN- γ semble donc jouer un rôle central dans l'inhibition des réponses allergiques. Dans mon travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence que la tolérance induite par l'administration orale d'un antigène en début de vie était médiée par l'IFN- γ . Ceci résulte en une diminution des réponses allergiques au niveau respiratoire, confirmant ainsi le rôle majeur que l'IFN- γ peut avoir sur le développement des maladies allergiques.

3) L'IFN- γ en début de vie

L'apparition des premiers symptômes allergiques en tout début de vie ont fait de la prévention une voie privilégiée d'action contre la prévalence croissante des maladies allergiques. A cette fin, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition de ces maladies est cruciale. Au niveau du système immunitaire, la maturation au cours des premières semaines d'une réponse Th1 qui permet de lutter contre les infections et d'inhiber la programmation Th2 des cellules immunitaires semble être au centre de l'ontogénie des allergies (Holt et al., 2005). Un certain nombre d'études ont mis en évidence un lien étroit entre des taux bas d'IFN- γ en début de vie et la pathogénèse des maladies allergiques (Guerra et al., 2004; Prescott et al., 1999; Stern et al., 2007; Tang et al., 1994). Les taux réduits d'IFN- γ en début de vie s'expliquent par la nécessité d'inhiber la transcription du gène de l'IFN- γ afin d'éviter des effets délétères sur le fœtus, résultant en un avortement spontané (Wegmann et al., 1993). Après la naissance, il y a une augmentation progressive de la capacité des lymphocytes T à sécréter de l'IFN- γ . Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans la maturation de cette réponse Th1. Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que

l'augmentation progressive des taux de vitamine A au cours des premières semaines de vie était directement liée à l'amélioration progressive de la capacité des cellules dendritiques du nouveau-né à induire des réponses Th1. Ainsi, les taux de vitamine A néonataux pourraient en partie expliquer la maturation des réponses Th1 en début de vie, et une supplémentation en vitamine A en début de vie permettrait d'augmenter les réponses Th1, résultant en une meilleure réponse aux infections (déjà décrite dans la littérature) mais également en une diminution des réponses allergiques.

Une autre voie d'amélioration de la prévention des maladies allergiques en début de vie est l'exposition microbienne. En effet, la maturation Th1 des réponses immunitaires du nouveau-né est améliorée en cas d'exposition microbienne en début de vie (Gereda et al., 2000). De plus, de nombreux marqueurs de l'exposition microbienne en tout début de vie (vie à la ferme, exposition aux acariens ou aux animaux...) ont été démontrés comme inducteurs de réponse Th1 via la sécrétion d'IFN- γ et inhibiteurs du développement de maladies allergiques (Roponen et al., 2005). Plus de 80 études ont démontré le lien entre l'exposition aux microbes en début de vie et le développement des maladies allergiques (théorie de l'hygiène). Ces études ont démontré que le risque allergique était réduit lors d'une exposition à un grand nombre d'autres enfants, à des animaux, à de la poussière, à de l'eau potentiellement contaminée ou encore à la vie de ferme (von Mutius, 2007). La découverte du rôle potentiel de l'épigénétique sur l'impact de l'IFN- γ sur le développement des maladies allergiques a ouvert de nouvelles voies d'études afin de mieux comprendre comment l'exposition microbienne peut agir directement sur les maladies allergiques. En effet, l'exposition microbienne pourrait lever l'inhibition Th1 induite par la méthylation du locus de l'IFN- γ et ainsi permettre une sécrétion accrue d'IFN- γ , inhibant ainsi la génération de maladies allergiques (Vuillermin et al., 2009).

En conclusion, l'IFN- γ pourrait être une voie à privilégier afin de prévenir le développement des maladies allergiques en début de vie.

Conclusions générales et perspectives

Les observations originales que j'ai réalisées au cours de mon travail de thèse ont permis d'apporter des connaissances fondamentales essentielles sur le nouveau-né :

- A la naissance, le nouveau-né est physiologiquement déficient en vitamine A, ce qui induit un défaut de fonction de ses cellules dendritiques, résultant en une incapacité à mettre en place de la tolérance orale. Très peu d'études se sont intéressées aux cellules dendritiques CD103+ méésentériques du nouveau-né, or il apparaît que ces cellules, essentielles à l'induction de tolérance orale, sont particulièrement déficientes en période néonatale.
- Lorsque les taux de vitamine A sont équilibrés (suite à une supplémentation ou au cours de la 3^{ème} semaine de vie), il est possible d'induire de la tolérance orale en début de vie. Le mécanisme impliqué dans cette induction de tolérance orale est différent de l'adulte puisqu'il ne consiste pas en l'induction de lymphocytes T régulateurs mais en une différenciation Th1 des lymphocytes T effecteurs. L'IFN- γ est la cytokine clé de la tolérance orale en début de vie.

Ces observations mettent en évidence les spécificités propres au nouveau-né : suite à la régulation très précise du passage de la vitamine A in utero, le nouveau-né est déficient en vitamine A. Cette carence impacte son système immunitaire et le rend inapte en début de vie à établir de la tolérance suite à l'administration orale d'un antigène, un mécanisme de régulation essentiel à l'homéostasie immunitaire en général et à la prévention des allergies plus particulièrement. Ces résultats devront être confirmés dans d'autres modèles de maladies allergiques telles que des allergies alimentaires ou des allergies respiratoires à l'encontre d'autres allergènes respiratoires tels que les acariens ou le pollen. Il apparaît ensuite essentiel de réaliser des études de corrélation chez l'Homme entre les différentes composantes du lait maternel et l'apparition de symptômes allergiques chez l'enfant, afin de mettre en place de nouvelles recommandations pour la prévention des maladies allergiques par l'allaitement, adaptées et spécifiques au début de vie, telles que l'exposition aux allergènes ou la supplémentation en vitamine A de la mère allaitante ou directement au nouveau-né.

Par ailleurs, les effets de la vitamine A sur la maturation des cellules dendritiques du système digestif du nouveau-né et l'induction de réponses Th1 pourraient également expliquer l'effet bénéfique de la supplémentation en vitamine A dans les pays carencés sur le risque de maladies infectieuses entériques. Enfin, l'implication de l'IFN- γ dans la tolérance orale en début de vie devra également être prise en compte pour le suivi de l'efficacité de stratégie de prévention des maladies allergiques.

Nos travaux soulignent les spécificités du fonctionnement du système immunitaire du nouveau-né et contribueront, je l'espère, à la recherche d'approches thérapeutiques mieux adaptées à cette période particulière de la vie.

Références

Abrahamsson, T.R., Jakobsson, H.E., Andersson, A.F., Bjorksten, B., Engstrand, L., and Jenmalm, M.C. (2012). Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129, 434-440, 440 e431-432.

Abrahamsson, T.R., Jakobsson, H.E., Andersson, A.F., Bjorksten, B., Engstrand, L., and Jenmalm, M.C. (2014). Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44, 842-850.

Adkins, B., Bu, Y., and Guevara, P. (2001). The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol* 166, 918-925.

Adkins, B., and Du, R.Q. (1998). Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. *J Immunol* 160, 4217-4224.

Adkins, B., Leclerc, C., and Marshall-Clarke, S. (2004). Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature reviews. Immunology* 4, 553-564.

Agace, W.W., and Persson, E.K. (2012). How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends in immunology* 33, 42-48.

Agarwal, S., and Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9, 765-775.

Agunod, M., Yamaguchi, N., Lopez, R., Luhby, A.L., and Glass, G.B. (1969). Correlative study of hydrochloric acid, pepsin, and intrinsic factor secretion in newborns and infants. *The American journal of digestive diseases* 14, 400-414.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature immunology* 2, 725-731.

Akdis, M. (2006). Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 18, 738-744.

al-Sabbagh, A., Miller, A., Santos, L.M., and Weiner, H.L. (1994). Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL mouse. *European journal of immunology* 24, 2104-2109.

Al Senaidy, A.M. (2009). Serum vitamin A and beta-carotene levels in children with asthma. *J Asthma* 46, 699-702.

Alexander, A.N., and Carey, H.V. (1999). Oral IGF-I enhances nutrient and electrolyte absorption in neonatal piglet intestine. *The American journal of physiology* 277, G619-625.

Anderson, M., and Fritsche, K.L. (2002). (n-3) Fatty acids and infectious disease resistance. *The Journal of nutrition* 132, 3566-3576.

Andersson, Y., Lindquist, S., Lagerqvist, C., and Hernell, O. (2000). Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early human development* 59, 95-105.

Annacker, O., Coombes, J.L., Malmstrom, V., Uhlig, H.H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., Parker, C.M., and Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *The Journal of experimental medicine* 202, 1051-1061.

Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine* 199, 1401-1408.

Arora, P., Kumar, V., and Batra, S. (2002). Vitamin A status in children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 13, 223-226.

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature reviews. Immunology* 8, 411-420.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 184, 387-396.

Aspinall, R., Prentice, A.M., and Ngom, P.T. (2011). Interleukin 7 from maternal milk crosses the intestinal barrier and modulates T-cell development in offspring. *PloS one* 6, e20812.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-236.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science (New York, N.Y)* 331, 337-341.

Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., and Rao, A. (2002). T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature immunology* 3, 643-651.

Bach, J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* 347, 911-920.

Baker, C.J. (2013). The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. *Vaccine* 31 Suppl 4, D3-6.

Ballesteros-Tato, A., Leon, B., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8(+) T cell responses to influenza. *Nature immunology* 11, 216-224.

Ballow, M., Wang, W., and Xiang, S. (1996). Modulation of B-cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. *Clinical immunology and immunopathology* 80, S73-81.

Barrios, C., Brandt, C., Berney, M., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (1996a). Partial correction of the TH2/TH1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. *European journal of immunology* 26, 2666-2670.

Barrios, C., Brawand, P., Berney, M., Brandt, C., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (1996b). Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *European journal of immunology* 26, 1489-1496.

Battaglia, M., Gianfrani, C., Gregori, S., and Roncarolo, M.G. (2004). IL-10-producing T regulatory type 1 cells and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1029, 142-153.

Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., *et al.* (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature immunology* 10, 488-495.

Bellmann, K., Kolb, H., Hartmann, B., Rothe, H., Rowsell, P., Rastegar, S., Burghardt, K., and Scott, F.W. (1997). Intervention in autoimmune diabetes by targeting the gut immune system. *International journal of immunopharmacology* 19, 573-577.

Bendele, A. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 1, 377-385.

Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R.J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *The Journal of experimental medicine* 204, 1765-1774.

Berin, M.C., Kiliaan, A.J., Yang, P.C., Groot, J.A., Taminiau, J.A., and Perdue, M.H. (1997). Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* 113, 856-864.

Bernton, E.W., Meltzer, M.S., and Holaday, J.W. (1988). Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science (New York, N.Y)* 239, 401-404.

Berseth, C.L. (1987). Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by epidermal growth factor in milk. *The American journal of physiology* 253, G662-665.

Berzins, S.P., Boyd, R.L., and Miller, J.F. (1998). The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *The Journal of experimental medicine* 187, 1839-1848.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Bevilacqua, C., Montagnac, G., Benmerah, A., Candalh, C., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N., Perdue, M.H., and Heyman, M. (2004). Food allergens are protected from degradation during CD23-mediated transepithelial transport. *International archives of allergy and immunology* 135, 108-116.

Billingham, R.E., Brent, L., and Medawar, P.B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172, 603-606.

Bitar, D.M., and Whitacre, C.C. (1988). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein. *Cellular immunology* 112, 364-370.

Bjorksten, B. (2004). Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Semin Immunopathol* 25, 257-270.

Blaner, W.S., O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D.M., Jiang, H., Schwabe, R.F., Hillman, E.M., Piantedosi, R., and Libien, J. (2009). Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica et biophysica acta* 1791, 467-473.

Blaner, W.S., Obunike, J.C., Kurlandsky, S.B., al-Haideri, M., Piantedosi, R., Deckelbaum, R.J., and Goldberg, I.J. (1994). Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *The Journal of biological chemistry* 269, 16559-16565.

Blomhoff, R. (1994). Transport and metabolism of vitamin A. *Nutrition reviews* 52, S13-23.

Blum, J.W., and Baumrucker, C.R. (2008). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins, and other endocrine factors in milk: role in the newborn. *Advances in experimental medicine and biology* 606, 397-422.

Bogaert, D., Weinberger, D., Thompson, C., Lipsitch, M., and Malley, R. (2009). Impaired innate and adaptive immunity to *Streptococcus pneumoniae* and its effect on colonization in an infant mouse model. *Infection and immunity* 77, 1613-1622.

Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D., and Mavilio, F. (1991). HOX gene activation by retinoic acid. *Trends in genetics : TIG* 7, 329-334.

Bottcher, M.F., Jenmalm, M.C., Garofalo, R.P., and Bjorksten, B. (2000). Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers. *Pediatric research* 47, 157-162.

Boullier, S., Tanguy, M., Kadaoui, K.A., Caubet, C., Sansonetti, P., Cortes, B., and Phalipon, A. (2009). Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J Immunol* 183, 5879-5885.

Bousquet, J., Lockey, R., and Malling, H.J. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *The Journal of allergy and clinical immunology* 102, 558-562.

Boylan, J.F., Lufkin, T., Achkar, C.C., Taneja, R., Chambon, P., and Gudas, L.J. (1995). Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Molecular and cellular biology* 15, 843-851.

Brambell, F.W. (1966). The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet* 2, 1087-1093.

Brand, S., Kesper, D.A., Teich, R., Kilic-Niebergall, E., Pinkenburg, O., Bothur, E., Lohoff, M., Garn, H., Pfefferle, P.I., and Renz, H. (2012). DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129, 1602-1610 e1606.

Brandtzaeg, P. (2003). Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 21, 3382-3388.

Brauer, M., Hoek, G., Smit, H.A., de Jongste, J.C., Gerritsen, J., Postma, D.S., Kerkhof, M., and Brunekreef, B. (2007). Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *The European respiratory journal* 29, 879-888.

Brown, Z. (2004). Preventing herpes simplex virus transmission to the neonate. *Herpes : the journal of the IHMF* 11 Suppl 3, 175A-186A.

Bruce, M.G., and Ferguson, A. (1986). The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology* 59, 295-300.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 27, 68-73.

Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., and Farrar, M.A. (2007). IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 178, 280-290.

Burks, A.W. (2008). Peanut allergy. *Lancet* 371, 1538-1546.

Burks, A.W., Laubach, S., and Jones, S.M. (2008). Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121, 1344-1350.

Calder, P.C., and Grimble, R.F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *European journal of clinical nutrition* 56 Suppl 3, S14-19.

Calder, P.C., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F.A., and Miles, E.A. (2002). Fatty acids and lymphocyte functions. *The British journal of nutrition* 87 Suppl 1, S31-48.

Carman, J.A., Smith, S.M., and Hayes, C.E. (1989). Characterization of a helper T lymphocyte defect in vitamin A-deficient mice. *J Immunol* 142, 388-393.

Carreira, H., Bastos, A., Peleteiro, B., and Lunet, N. (2014). Breast-feeding and *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Public health nutrition*, 1-21.

Cassani, B., Villablanca, E.J., De Calisto, J., Wang, S., and Mora, J.R. (2011a). Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Mol Aspects Med*.

Cassani, B., Villablanca, E.J., Quintana, F.J., Love, P.E., Lacy-Hulbert, A., Blaner, W.S., Sparwasser, T., Snapper, S.B., Weiner, H.L., and Mora, J.R. (2011b). Gut-tropic T cells that express integrin alpha4beta7 and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology* 141, 2109-2118.

Caulfield, M.J., and Shaffer, D. (1987). Immunoregulation by antigen/antibody complexes. I. Specific immunosuppression induced in vivo with immune complexes formed in antibody excess. *J Immunol* 138, 3680-3683.

Cha, H.R., Chang, S.Y., Chang, J.H., Kim, J.O., Yang, J.Y., Kim, C.H., and Kweon, M.N. (2010). Downregulation of Th17 cells in the small intestine by disruption of gut flora in the absence of retinoic acid. *J Immunol* 184, 6799-6806.

Chambon, P. (1993). The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. *Gene* 135, 223-228.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10, 940-954.

Chan, A., Hanna, M., Abbott, M., and Keane, R.J. (1996). Oral retinoids and pregnancy. *The Medical journal of Australia* 165, 164-167.

Chappell, J.E., Francis, T., and Clandinin, M.T. (1985). Vitamin A and E content of human milk at early stages of lactation. *Early human development* 11, 157-167.

Chen, F., Marquez, H., Kim, Y.K., Qian, J., Shao, F., Fine, A., Cruikshank, W.W., Quadro, L., and Cardoso, W.V. (2014). Prenatal retinoid deficiency leads to airway hyperresponsiveness in adult mice. *J Clin Invest* 124, 801-811.

Chen, M.L., Yan, B.S., Bando, Y., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (2008). Latency-associated peptide identifies a novel CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 7327-7337.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.

Chen, Y., Inobe, J., and Weiner, H.L. (1995). Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4⁺ and CD8⁺ cells mediate active suppression. *J Immunol* 155, 910-916.

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y)* 265, 1237-1240.

Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine* 203, 2841-2852.

Chirido, F.G., Millington, O.R., Beacock-Sharp, H., and Mowat, A.M. (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *European journal of immunology* 35, 1831-1840.

Chirido, F.G., Rumbo, M., Anon, M.C., and Fossati, C.A. (1998). Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol* 33, 1186-1192.

Chu, C.Q., Swart, D., Alcorn, D., Tocker, J., and Elkon, K.B. (2007). Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. *Arthritis and rheumatism* 56, 1145-1151.

Chu, C.Q., Wittmer, S., and Dalton, D.K. (2000). Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 192, 123-128.

Clagett-Dame, M., and DeLuca, H.F. (2002). The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual review of nutrition* 22, 347-381.

Clagett-Dame, M., and Knutson, D. (2011). Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* 3, 385-428.

Cohlan, S.Q. (1954). Congenital anomalies in the rat produced by excessive intake of vitamin A during pregnancy. *Pediatrics* 13, 556-567.

Cohn, L., Homer, R.J., Niu, N., and Bottomly, K. (1999). T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *The Journal of experimental medicine* 190, 1309-1318.

Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204, 1757-1764.

Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of lipid research* 38, 2173-2192.

Cumano, A., and Godin, I. (2001). Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Current opinion in immunology* 13, 166-171.

Cummins, A.G., and Thompson, F.M. (2002). Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut* 51, 748-754.

D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., and Blaner, W.S. (2011). Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3, 63-103.

D'Vaz, N., Meldrum, S.J., Dunstan, J.A., Martino, D., McCarthy, S., Metcalfe, J., Tulic, M.K., Mori, T.A., and Prescott, S.L. (2012). Postnatal fish oil supplementation in high-risk infants to prevent allergy: randomized controlled trial. *Pediatrics* 130, 674-682.

Dadaglio, G., Sun, C.M., Lo-Man, R., Siegrist, C.A., and Leclerc, C. (2002). Efficient in vivo priming of specific cytotoxic T cell responses by neonatal dendritic cells. *J Immunol* 168, 2219-2224.

Dakic, A., Shao, Q.X., D'Amico, A., O'Keeffe, M., Chen, W.F., Shortman, K., and Wu, L. (2004). Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol* 172, 1018-1027.

Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4022-4026.

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34, 2480-2488.

De Luca, L.M. (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5, 2924-2933.

de Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., and Roberts, D.J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 1322-1332.

Debock, I., Delbauve, S., Dubois, A., Petein, M., Leo, O., Goldman, M., and Flamand, V. (2012). Th17 alloimmunity prevents neonatal establishment of lymphoid chimerism in IL-4-deprived mice.

American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 12, 81-89.

Del Prete, G.F., De Carli, M., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991). Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *The Journal of experimental medicine* 174, 809-813.

Delvin, E.E., Salle, B.L., Reygrobelle, B., Mellier, G., and Claris, O. (2000). Vitamin A and E supplementation in breast-fed newborns. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31, 562-565.

den Haan, J.M., and Bevan, M.J. (2001). Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Current opinion in immunology* 13, 437-441.

Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature immunology* 8, 1086-1094.

DePaolo, R.W., Abadie, V., Tang, F., Fehlner-Peach, H., Hall, J.A., Wang, W., Marietta, E.V., Kasarda, D.D., Waldmann, T.A., Murray, J.A., *et al.* (2011). Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature* 471, 220-224.

Devereux, G. (2006). The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nature reviews. Immunology* 6, 869-874.

Di Giacinto, C., Marinaro, M., Sanchez, M., Strober, W., and Boirivant, M. (2005). Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 174, 3237-3246.

Di Sabatino, A., and Corazza, G.R. (2009). Coeliac disease. *Lancet* 373, 1480-1493.

Dogaru, C.M., Nyffenegger, D., Pescatore, A.M., Spycher, B.D., and Kuehni, C.E. (2014). Breastfeeding and childhood asthma: systematic review and meta-analysis. *American journal of epidemiology* 179, 1153-1167.

Doneray, H., Orbak, Z., and Yildiz, L. (2009). The relationship between breast milk leptin and neonatal weight gain. *Acta paediatrica* 98, 643-647.

Donnet-Hughes, A., Duc, N., Serrant, P., Vidal, K., and Schiffrin, E.J. (2000). Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor-beta. *Immunology and cell biology* 78, 74-79.

Dowling, J.E., and Wald, G. (1960). The Biological Function of Vitamin a Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 46, 587-608.

Drager, U.C., Wagner, E., and McCaffery, P. (1998). Aldehyde dehydrogenases in the generation of retinoic acid in the developing vertebrate: a central role of the eye. *The Journal of nutrition* 128, 463S-466S.

Duan, W., So, T., Mehta, A.K., Choi, H., and Croft, M. (2011). Inducible CD4+LAP+Foxp3- regulatory T cells suppress allergic inflammation. *J Immunol* 187, 6499-6507.

Duchen, K., Yu, G., and Bjorksten, B. (1998). Atopic sensitization during the first year of life in relation to long chain polyunsaturated fatty acid levels in human milk. *Pediatric research* 44, 478-484.

Duijts, L., Jaddoe, V.W., Hofman, A., and Moll, H.A. (2010). Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics* 126, e18-25.

Duijts, L., Ramadhani, M.K., and Moll, H.A. (2009). Breastfeeding protects against infectious diseases during infancy in industrialized countries. A systematic review. *Maternal & child nutrition* 5, 199-210.

Dujardin, H.C., Buren-Defranoux, O., Boucontet, L., Vieira, P., Cumano, A., and Bandeira, A. (2004). Regulatory potential and control of Foxp3 expression in newborn CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14473-14478.

Dunstan, J.A., Mori, T.A., Barden, A., Beilin, L.J., Taylor, A.L., Holt, P.G., and Prescott, S.L. (2003). Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112, 1178-1184.

Dunstan, J.A., Roper, J., Mitoulas, L., Hartmann, P.E., Simmer, K., and Prescott, S.L. (2004). The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14,

cytokine levels and fatty acid composition. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 34, 1237-1242.

Duong, T.T., Finkelman, F.D., Singh, B., and Strejan, G.H. (1994). Effect of anti-interferon-gamma monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. *Journal of neuroimmunology* 53, 101-107.

Dvorak, B. (2010). Milk epidermal growth factor and gut protection. *The Journal of pediatrics* 156, S31-35.

Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *The New England journal of medicine* 355, 2226-2235.

Eglinton, B.A., Robertson, D.M., and Cummins, A.G. (1994). Phenotype of T cells, their soluble receptor levels, and cytokine profile of human breast milk. *Immunology and cell biology* 72, 306-313.

Ellis, L.A., and Picciano, M.F. (1995). Bioactive and immunoreactive prolactin variants in human milk. *Endocrinology* 136, 2711-2720.

Ellison, R.T., 3rd, and Giehl, T.J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of clinical investigation* 88, 1080-1091.

Ertesvag, A., Engedal, N., Naderi, S., and Blomhoff, H.K. (2002). Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *J Immunol* 169, 5555-5563.

Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172, 5149-5153.

Faria, A.M., and Weiner, H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunological reviews* 206, 232-259.

Fernandez, M.A., Puttur, F.K., Wang, Y.M., Howden, W., Alexander, S.I., and Jones, C.A. (2008). T regulatory cells contribute to the attenuated primary CD8+ and CD4+ T cell responses to herpes simplex virus type 2 in neonatal mice. *J Immunol* 180, 1556-1564.

Ferrara, J.L., and Deeg, H.J. (1991). Graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 324, 667-674.

Fevrier, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology* 16, 415-421.

Field, C.J., Clandinin, M.T., and Van Aerde, J.E. (2001). Polyunsaturated fatty acids and T-cell function: implications for the neonate. *Lipids* 36, 1025-1032.

Filteau, S.M. (2001). Milk components with immunomodulatory potential. *Advances in nutritional research* 10, 327-350.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine* 170, 2081-2095.

Fleischer, D.M., Spergel, J.M., Assa'ad, A.H., and Pongratic, J.A. (2013). Primary prevention of allergic disease through nutritional interventions. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 1, 29-36.

Fontenot, J.D., Dooley, J.L., Farr, A.G., and Rudensky, A.Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *The Journal of experimental medicine* 202, 901-906.

Forbes, E.E., Groschwitz, K., Abonia, J.P., Brandt, E.B., Cohen, E., Blanchard, C., Ahrens, R., Seidu, L., McKenzie, A., Strait, R., *et al.* (2008). IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. *The Journal of experimental medicine* 205, 897-913.

Forsthuber, T., Yip, H.C., and Lehmann, P.V. (1996). Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. *Science (New York, N.Y)* 271, 1728-1730.

Fowell, D., and Mason, D. (1993). Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *The Journal of experimental medicine* 177, 627-636.

Friedman, A., and Weiner, H.L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6688-6692.

Friedman, S.L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* 88, 125-172.

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., *et al.* (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31, 677-689.

Garcia, A.L., Ruhl, R., and Schweigert, F.J. (2005). Retinoid concentrations in the mouse during postnatal development and after maternal vitamin A supplementation. *Ann Nutr Metab* 49, 333-341.

Garofalo, R. (2010). Cytokines in human milk. *The Journal of pediatrics* 156, S36-40.

Garofalo, R., Chheda, S., Mei, F., Palkowetz, K.H., Rudloff, H.E., Schmalstieg, F.C., Rassin, D.K., and Goldman, A.S. (1995). Interleukin-10 in human milk. *Pediatric research* 37, 444-449.

Garrett, W.S., Gordon, J.I., and Glimcher, L.H. (2010). Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 140, 859-870.

Gdalevich, M., Mimouni, D., and Mimouni, M. (2001). Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *The Journal of pediatrics* 139, 261-266.

Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P., and Dy, M. (2003). Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 623-634.

Gereda, J.E., Leung, D.Y., Thatayatikom, A., Streib, J.E., Price, M.R., Klennert, M.D., and Liu, A.H. (2000). Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 355, 1680-1683.

Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., and Liebhaver, S.A. (1972). Suppressor T cells. *J Immunol* 108, 586-590.

Golding, J., Emmett, P.M., and Rogers, I.S. (1997). Gastroenteritis, diarrhoea and breast feeding. *Early human development* 49 Suppl, S83-103.

Goodman, D.S. (1984). Vitamin A and retinoids in health and disease. *The New England journal of medicine* 310, 1023-1031.

Goodman, D.W., Huang, H.S., and Shiratori, T. (1965). Tissue Distribution and Metabolism of Newly Absorbed Vitamin a in the Rat. *Journal of lipid research* 6, 390-396.

Goriely, S., Vincart, B., Stordeur, P., Vekemans, J., Willems, F., Goldman, M., and De Wit, D. (2001). Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol* 166, 2141-2146.

Green, P.H., and Glickman, R.M. (1981). Intestinal lipoprotein metabolism. *Journal of lipid research* 22, 1153-1173.

Greiner, A.N., Hellings, P.W., Rotiroti, G., and Scadding, G.K. (2011). Allergic rhinitis. *Lancet* 378, 2112-2122.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.

Grove, D.S., Bour, B., Kacsoh, B., and Mastro, A.M. (1991). Effect of neonatal milk-prolactin deprivation on the ontogeny of the immune system of the rat. *Endocrine regulations* 25, 111-119.

Gudas, L.J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *The Journal of biological chemistry* 269, 15399-15402.

Guerra, S., Lohman, I.C., Halonen, M., Martinez, F.D., and Wright, A.L. (2004). Reduced interferon gamma production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by 1 year of age. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169, 70-76.

Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., de Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* 115, 1958-1968.

Guillonneau, M., and Jacqz-Aigrain, E. (1997). [Teratogenic effects of vitamin A and its derivatives]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 4, 867-874.

Gullberg, R. (1973). Possible influence of vitamin B12-binding protein in milk on the intestinal flora in breast-fed infants. I. B12-binding proteins in human and bovine milk. *Scandinavian journal of gastroenterology* 8, 497-503.

Guo, L., Hu-Li, J., Zhu, J., Watson, C.J., Difilippantonio, M.J., Pannetier, C., and Paul, W.E. (2002). In TH2 cells the IL4 gene has a series of accessibility states associated with distinctive probabilities of IL-4 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10623-10628.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Muller, W., Sparwasser, T., Forster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34, 237-246.

Hall, J.A., Cannons, J.L., Grainger, J.R., Dos Santos, L.M., Hand, T.W., Naik, S., Wohlfert, E.A., Chou, D.B., Oldenhove, G., Robinson, M., *et al.* (2011a). Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. *Immunity* 34, 435-447.

Hall, J.A., Grainger, J.R., Spencer, S.P., and Belkaid, Y. (2011b). The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* 35, 13-22.

Hammerschmidt, S.I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Forster, R., and Pabst, O. (2008). Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 205, 2483-2490.

Hamosh, M. (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatric clinics of North America* 48, 69-86.

Hanson, D.G. (1981). Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. *J Immunol* 127, 1518-1524.

Hanson, L.A. (1961). Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and of blood serum. *International archives of allergy and applied immunology* 18, 241-267.

Hanson, L.A. (1998). Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 81, 523-533; quiz 533-524, 537.

Hanson, L.A., Korotkova, M., Lundin, S., Haversen, L., Silfverdal, S.A., Mattsby-Baltzer, I., Strandvik, B., and Telemo, E. (2003). The transfer of immunity from mother to child. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987, 199-206.

Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *European journal of cell biology* 35, 256-263.

Harmesen, M.C., Swart, P.J., de Bethune, M.P., Pauwels, R., De Clercq, E., The, T.H., and Meijer, D.K. (1995). Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *The Journal of infectious diseases* 172, 380-388.

Harper, J., Mould, A., Andrews, R.M., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2011). The transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 regulates postnatal reprogramming of intestinal enterocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 10585-10590.

Harrison, E.H., Gad, M.Z., and Ross, A.C. (1995). Hepatic uptake and metabolism of chylomicron retinyl esters: probable role of plasma membrane/endosomal retinyl ester hydrolases. *Journal of lipid research* 36, 1498-1506.

Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., *et al.* (2009). Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226-230.

Haskell, M.J., and Brown, K.H. (1999). Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 243-257.

Hasselbalch, H., Engelmann, M.D., Ersboll, A.K., Jeppesen, D.L., and Fleischer-Michaelsen, K. (1999). Breast-feeding influences thymic size in late infancy. *European journal of pediatrics* 158, 964-967.

Haversen, L., Ohlsson, B.G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L.A., and Mattsby-Baltzer, I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. *Cellular immunology* 220, 83-95.

Hawkes, J.S., Neumann, M.A., and Gibson, R.A. (1999). The effect of breast feeding on lymphocyte subpopulations in healthy term infants at 6 months of age. *Pediatric research* 45, 648-651.

Henning, S.J. (1981). Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *The American journal of physiology* 241, G199-214.

Heyman, M., Crain-Denoyelle, A.M., Corthier, G., Morgat, J.L., and Desjeux, J.F. (1986). Postnatal development of protein absorption in conventional and germ-free mice. *The American journal of physiology* 251, G326-331.

Heyman, M., Ducroc, R., Desjeux, J.F., and Morgat, J.L. (1982). Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *The American journal of physiology* 242, G558-564.

Heyman, M., Grasset, E., Ducroc, R., and Desjeux, J.F. (1988). Antigen absorption by the jejunal epithelium of children with cow's milk allergy. *Pediatric research* 24, 197-202.

Higgins, P.J., and Weiner, H.L. (1988). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. *J Immunol* 140, 440-445.

Hill, J.A., Hall, J.A., Sun, C.M., Cai, Q., Ghyselinck, N., Chambon, P., Belkaid, Y., Mathis, D., and Benoist, C. (2008). Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4⁺CD44^{hi} Cells. *Immunity* 29, 758-770.

Hofstetter, H.H., Kovalovsky, A., Shive, C.L., Lehmann, P.V., and Forsthuber, T.G. (2007). Neonatal induction of myelin-specific Th1/Th17 immunity does not result in experimental autoimmune encephalomyelitis and can protect against the disease in adulthood. *Journal of neuroimmunology* 187, 20-30.

Holsapple, M.P., West, L.J., and Landreth, K.S. (2003). Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 68, 321-334.

Holt, P.G., Upham, J.W., and Sly, P.D. (2005). Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116, 16-24; quiz 25.

Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.

Host, A. (2002). Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 89, 33-37.

Houle, V.M., Park, Y.K., Laswell, S.C., Freund, G.G., Dudley, M.A., and Donovan, S.M. (2000). Investigation of three doses of oral insulin-like growth factor-I on jejunal lactase phlorizin hydrolase activity and gene expression and enterocyte proliferation and migration in piglets. *Pediatric research* 48, 497-503.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science (New York, N.Y)* 260, 547-549.

Humphrey, J.H., and Rice, A.L. (2000). Vitamin A supplementation of young infants. *Lancet* 356, 422-424.

Iliev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2009a). Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal immunology* 2, 340-350.

Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G., and Rescigno, M. (2009b). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58, 1481-1489.

Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., and Steinman, R.M. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 186, 665-672.

Inada, S., Yoshino, S., Haque, M.A., Ogata, Y., and Kohashi, O. (1997). Clonal anergy is a potent mechanism of oral tolerance in the suppression of acute antigen-induced arthritis in rats by oral administration of the inducing antigen. *Cellular immunology* 175, 67-75.

Israel, E.J., Taylor, S., Wu, Z., Mizoguchi, E., Blumberg, R.S., Bhan, A., and Simister, N.E. (1997). Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* 92, 69-74.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133.

Iwamoto, I., Nakajima, H., Endo, H., and Yoshida, S. (1993). Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 177, 573-576.

Iwata, M., Eshima, Y., and Kagechika, H. (2003). Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *International immunology* 15, 1017-1025.

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21, 527-538.

Jackson, K.A., Iwamoto, M., and Swerdlow, D. (2010). Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiology and infection* 138, 1503-1509.

Jaensson-Gyllenback, E., Kotarsky, K., Zapata, F., Persson, E.K., Gundersen, T.E., Blomhoff, R., and Agace, W.W. (2011). Bile retinoids imprint intestinal CD103+ dendritic cells with the ability to generate gut-tropic T cells. *Mucosal immunology* 4, 438-447.

Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. (2007). Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178, 1433-1442.

Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., and Agace, W.W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202, 1063-1073.

Jones, E.A., and Waldmann, T.A. (1971). The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *Gut* 12, 855-856.

Jones, G., Steketee, R.W., Black, R.E., Bhutta, Z.A., Morris, S.S., and Bellagio Child Survival Study, G. (2003). How many child deaths can we prevent this year? *Lancet* 362, 65-71.

Kacsoh, B., Veress, Z., Toth, B.E., Avery, L.M., and Grosvenor, C.E. (1993). Bioactive and immunoreactive variants of prolactin in milk and serum of lactating rats and their pups. *The Journal of endocrinology* 138, 243-257.

Kadaoui, K.A., and Corthesy, B. (2007). Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J Immunol* 179, 7751-7757.

Kamath, A.T., Pooley, J., O'Keeffe, M.A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A.M., D'Amico, A., Wu, L., Tough, D.F., and Shortman, K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 165, 6762-6770.

Kamath, A.T., Rochat, A.F., Christensen, D., Agger, E.M., Andersen, P., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (2009). A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells. *PloS one* 4, e5771.

Kang, S.G., Wang, C., Matsumoto, S., and Kim, C.H. (2009). High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3+ T-cell subsets and effectively control intestinal inflammation. *Gastroenterology* 137, 1391-1402 e1391-1396.

Karimi, K., Inman, M.D., Bienenstock, J., and Forsythe, P. (2009). Lactobacillus reuteri-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179, 186-193.

Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I., and Telemo, E. (2001). "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *European journal of immunology* 31, 2892-2900.

Karlsson, M.R., Johansen, F.E., Kahu, H., Macpherson, A., and Brandtzaeg, P. (2010). Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system. *Allergy* 65, 561-570.

Karlsson, M.R., Rugtveit, J., and Brandtzaeg, P. (2004). Allergen-responsive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of experimental medicine* 199, 1679-1688.

Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.L., Dolle, P., and Chambon, P. (1994). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78, 987-1003.

Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D., and Sun, H. (2007). A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science (New York, N.Y.)* 315, 820-825.

Kelly, D., and Coutts, A.G. (2000). Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *The Proceedings of the Nutrition Society* 59, 177-185.

Khare, S.D., Krco, C.J., Griffiths, M.M., Luthra, H.S., and David, C.S. (1995). Oral administration of an immunodominant human collagen peptide modulates collagen-induced arthritis. *J Immunol* 155, 3653-3659.

Khoury, S.J., Hancock, W.W., and Weiner, H.L. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *The Journal of experimental medicine* 176, 1355-1364.

Kim, S.K., Keeney, S.E., Alpard, S.K., and Schmalstieg, F.C. (2003). Comparison of L-selectin and CD11b on neutrophils of adults and neonates during the first month of life. *Pediatric research* 53, 132-136.

Kim, Y.K., Wassef, L., Hamberger, L., Piantadosi, R., Palczewski, K., Blaner, W.S., and Quadro, L. (2008). Retinyl ester formation by lecithin: retinol acyltransferase is a key regulator of retinoid homeostasis in mouse embryogenesis. *The Journal of biological chemistry* 283, 5611-5621.

King, C., Davies, J., Mueller, R., Lee, M.S., Krah, T., Yeung, B., O'Connor, E., and Sarvetnick, N. (1998). TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 8, 601-613.

Kiraly, N., Balde, A., Lisse, I.M., Eriksen, H.B., Aaby, P., and Benn, C.S. (2013a). Vitamin A supplementation and risk of atopy: long-term follow-up of a randomized trial of vitamin A supplementation at six and nine months of age. *BMC pediatrics* 13, 190.

Kiraly, N., Benn, C.S., Biering-Sorensen, S., Rodrigues, A., Jensen, K.J., Ravn, H., Allen, K.J., and Aaby, P. (2013b). Vitamin A supplementation and BCG vaccination at birth may affect atopy in childhood: long-term follow-up of a randomized controlled trial. *Allergy* 68, 1168-1176.

Kitani, A., Fuss, I., Nakamura, K., Kumaki, F., Usui, T., and Strober, W. (2003). Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *The Journal of experimental medicine* 198, 1179-1188.

Kojima, A., and Prehn, R.T. (1981). Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics* 14, 15-27.

Kollmann, T.R., Way, S.S., Harowicz, H.L., Hajjar, A.M., and Wilson, C.B. (2004). Deficient MHC class I cross-presentation of soluble antigen by murine neonatal dendritic cells. *Blood* 103, 4240-4242.

Komatsu, T., Okao, M., Miyamoto, H., Chen, T., and Shinka, S. (1988). Effects of early antigen exposure through lactation on later specific antibody responses in mice. *J Immunol* 141, 2895-2906.

Korotkova, M., Telemo, E., Yamashiro, Y., Hanson, L.A., and Strandvik, B. (2004). The ratio of n-6 to n-3 fatty acids in maternal diet influences the induction of neonatal immunological tolerance to ovalbumin. *Clinical and experimental immunology* 137, 237-244.

Kramer, M.S., Matush, L., Vanilovich, I., Platt, R., Bogdanovich, N., Sevkovskaya, Z., Dzikovich, I., Shishko, G., and Mazer, B. (2007). Effect of prolonged and exclusive breast feeding on risk of allergy and asthma: cluster randomised trial. *Bmj*.

Krasinski, S.D., Estrada, G., Yeh, K.Y., Yeh, M., Traber, P.G., Rings, E.H., Buller, H.A., Verhave, M., Montgomery, R.K., and Grand, R.J. (1994). Transcriptional regulation of intestinal hydrolase biosynthesis during postnatal development in rats. *The American journal of physiology* 267, G584-594.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* 6, 1219-1227.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.

Kull, I., Almquist, C., Lilja, G., Pershagen, G., and Wickman, M. (2004). Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *The Journal of allergy and clinical immunology* 114, 755-760.

Kull, I., Bergstrom, A., Melen, E., Lilja, G., van Hage, M., Pershagen, G., and Wickman, M. (2006). Early-life supplementation of vitamins A and D, in water-soluble form or in peanut oil, and allergic diseases during childhood. *The Journal of allergy and clinical immunology* 118, 1299-1304.

Kweon, M.N., Fujihashi, K., VanCott, J.L., Higuchi, K., Yamamoto, M., McGhee, J.R., and Kiyono, H. (1998). Lack of orally induced systemic unresponsiveness in IFN-gamma knockout mice. *J Immunol* 160, 1687-1693.

Labbok, M.H., Clark, D., and Goldman, A.S. (2004). Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nature reviews. Immunology* 4, 565-572.

Ladomenou, F., Moschandreas, J., Kafatos, A., Tselentis, Y., and Galanakis, E. (2010). Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: a prospective study. *Archives of disease in childhood* 95, 1004-1008.

Laman, J.D., Claassen, E., and Noelle, R.J. (1996). Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Critical reviews in immunology* 16, 59-108.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2003). Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nature reviews. Immunology* 3, 994-1003.

Langrish, C.L., Buddle, J.C., Thrasher, A.J., and Goldblatt, D. (2002). Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clinical and experimental immunology* 128, 118-123.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201, 233-240.

Lantier, L., Lacroix-Lamande, S., Potiron, L., Metton, C., Drouet, F., Guesdon, W., Gnahoui-David, A., Le Vern, Y., Deriaud, E., Fenis, A., *et al.* (2013). Intestinal CD103+ dendritic cells are key players in the innate immune control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *PLoS pathogens* 9, e1003801.

Larche, M., Akdis, C.A., and Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* 6, 761-771.

Lauritzen, L., Kjaer, T.M., Fruekilde, M.B., Michaelsen, K.F., and Frokiaer, H. (2005). Fish oil supplementation of lactating mothers affects cytokine production in 2 1/2-year-old children. *Lipids* 40, 669-676.

Lawn, J.E., Cousens, S., and Zupan, J. (2005). 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* 365, 891-900.

Le Huerou-Luron, I., Blat, S., and Boudry, G. (2010). Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutrition research reviews* 23, 23-36.

Lee-Huang, S., Huang, P.L., Sun, Y., Huang, P.L., Kung, H.F., Blithe, D.L., and Chen, H.C. (1999). Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2678-2681.

Lee, D.U., Agarwal, S., and Rao, A. (2002). Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* 16, 649-660.

Lee, H.H., Hoeman, C.M., Hardaway, J.C., Guloglu, F.B., Ellis, J.S., Jain, R., Divekar, R., Tartar, D.M., Haymaker, C.L., and Zaghouani, H. (2008). Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell

subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *The Journal of experimental medicine* 205, 2269-2280.

Lee, H.O., Miller, S.D., Hurst, S.D., Tan, L.J., Cooper, C.J., and Barrett, T.A. (2000). Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T-cell migration to sites of inflammation. *Gastroenterology* 119, 129-138.

Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology* 14, 233-258.

Leonard, C., Tormey, V., Burke, C., and Poulter, L.W. (1997). Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 368-375.

Letterio, J.J., Geiser, A.G., Kulkarni, A.B., Roche, N.S., Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1994). Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science (New York, N.Y)* 264, 1936-1938.

Leung, D.Y., and Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet* 361, 151-160.

Li, L., Lee, H.H., Bell, J.J., Gregg, R.K., Ellis, J.S., Gessner, A., and Zaghouani, H. (2004). IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. *Immunity* 20, 429-440.

Li, M.O., and Flavell, R.A. (2008). TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 134, 392-404.

Lomo, J., Smeland, E.B., Ulven, S., Natarajan, V., Blomhoff, R., Gandhi, U., Dawson, M.I., and Blomhoff, H.K. (1998). RAR-, not RXR, ligands inhibit cell activation and prevent apoptosis in B-lymphocytes. *Journal of cellular physiology* 175, 68-77.

Lonnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition* 77, 1537S-1543S.

Lu, C.Y., Beller, D.I., and Unanue, E.R. (1980). During ontogeny, Ia-bearing accessory cells are found early in the thymus but late in the spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 1597-1601.

Lu, C.Y., Calamai, E.G., and Unanue, E.R. (1979). A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. *Nature* 282, 327-329.

Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMeur, M., and Chambon, P. (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7225-7229.

Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., and O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154, 5071-5079.

Macchiaverni, P., Rekima, A., Turfkruyer, M., Mascarell, L., Airouche, S., Moingeon, P., Adel-Patient, K., Condino-Neto, A., Annesi-Maesano, I., Prescott, S.L., *et al.* (2014). Respiratory allergen from house dust mite is present in human milk and primes for allergic sensitization in a mouse model of asthma. *Allergy* 69, 395-398.

Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., and Zile, M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Current biology : CB* 6, 417-426.

Malhotra, I., Ouma, J., Wamachi, A., Kioko, J., Mungai, P., Omollo, A., Elson, L., Koech, D., Kazura, J.W., and King, C.L. (1997). In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. *The Journal of clinical investigation* 99, 1759-1766.

Malling, H.J. (2002). Is sublingual immunotherapy clinically effective? *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2, 523-531.

Malvy, D.J., Burtshy, B., Dostalova, L., and Amedee-Manesme, O. (1993). Serum retinol, beta-carotene, alpha-tocopherol and cholesterol in healthy French children. *Int J Epidemiol* 22, 237-246.

Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.

Marc Rhoads, J., and Wu, G. (2009). Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino acids* 37, 111-122.

Mark, M., Ghyselinck, N.B., and Chambon, P. (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology* 46, 451-480.

Marodi, L. (2002). Down-regulation of Th1 responses in human neonates. *Clinical and experimental immunology* 128, 1-2.

Marogna, M., Bruno, M., Massolo, A., and Falagiani, P. (2007). Long-lasting effects of sublingual immunotherapy for house dust mites in allergic rhinitis with bronchial hyperreactivity: A long-term (13-year) retrospective study in real life. *International archives of allergy and immunology* 142, 70-78.

Maron, R., Guerau-de-Arellano, M., Zhang, X., and Weiner, H.L. (2001). Oral administration of insulin to neonates suppresses spontaneous and cyclophosphamide induced diabetes in the NOD mouse. *Journal of autoimmunity* 16, 21-28.

Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., MacIsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von Boehmer, H., and Young, R.A. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445, 931-935.

Martinez, F.D., and Vercelli, D. (2013). Asthma. *Lancet* 382, 1360-1372.

Martinez, X., Brandt, C., Saddallah, F., Tougne, C., Barrios, C., Wild, F., Dougan, G., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (1997). DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8726-8731.

Mascarell, L., Lombardi, V., Louise, A., Saint-Lu, N., Chabre, H., Moussu, H., Betbeder, D., Balazuc, A.M., Van Overtvelt, L., and Moingeon, P. (2008). Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 122, 603-609 e605.

Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology* 12, 5-9.

Matheu, V., Berggard, K., Barrios, Y., Arnau, M.R., Zubeldia, J.M., Baeza, M.L., Back, O., and Issazadeh-Navikas, S. (2009). Impact on allergic immune response after treatment with vitamin A. *Nutr Metab (Lond)* 6, 44.

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.

Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., and Rescigno, M. (2010). Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59, 595-604.

Mattsby-Baltzer, I., Roseanu, A., Motas, C., Elverfors, J., Engberg, I., and Hanson, L.A. (1996). Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatric research* 40, 257-262.

Matysiak-Budnik, T., Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Menard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., van Niel, G., *et al.* (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *The Journal of experimental medicine* 205, 143-154.

Mayer, L., and Shao, L. (2004). Therapeutic potential of oral tolerance. *Nature reviews. Immunology* 4, 407-419.

Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 231-241.

McCullough, F.S., Northrop-Clewes, C.A., and Thurnham, D.I. (1999). The effect of vitamin A on epithelial integrity. *The Proceedings of the Nutrition Society* 58, 289-293.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology* 9, 4-9.

Menard, S., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal immunology* 3, 247-259.

Menezes, J.S., Mucida, D.S., Cara, D.C., Alvarez-Leite, J.I., Russo, M., Vaz, N.M., and de Faria, A.M. (2003). Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *International immunology* 15, 447-455.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31, 563-604.

Michael, J.G. (1989). The role of digestive enzymes in orally induced immune tolerance. *Immunological investigations* 18, 1049-1054.

Miller, A., Lider, O., Abramsky, O., and Weiner, H.L. (1994). Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. *European journal of immunology* 24, 1026-1032.

Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Weiner, H.L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 421-425.

Milner, J.D., Stein, D.M., McCarter, R., and Moon, R.Y. (2004). Early infant multivitamin supplementation is associated with increased risk for food allergy and asthma. *Pediatrics* 114, 27-32.

Min, B., McHugh, R., Sempowski, G.D., Mackall, C., Foucras, G., and Paul, W.E. (2003). Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 18, 131-140.

Mitchell, C., Provost, K., Niu, N., Homer, R., and Cohn, L. (2011). IFN-gamma acts on the airway epithelium to inhibit local and systemic pathology in allergic airway disease. *J Immunol* 187, 3815-3820.

Mitchell, G.V., Young, M., and Seward, C.R. (1973). Vitamin A and carotene levels of a selected population in metropolitan Washington, D. C. *Am J Clin Nutr* 26, 992-997.

Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., and Heldin, C.H. (1991). A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO journal* 10, 1091-1101.

Mizuno, Y., Furusho, T., Yoshida, A., Nakamura, H., Matsuura, T., and Eto, Y. (2006). Serum vitamin A concentrations in asthmatic children in Japan. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 48, 261-264.

Molenaar, R., Greuter, M., van der Marel, A.P., Roozendaal, R., Martin, S.F., Edele, F., Huehn, J., Forster, R., O'Toole, T., Jansen, W., *et al.* (2009). Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells. *J Immunol* 183, 6395-6402.

Molenaar, R., Knippenberg, M., Goverse, G., Olivier, B.J., de Vos, A.F., O'Toole, T., and Mebius, R.E. (2011). Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A. *J Immunol* 186, 1934-1942.

Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., and Kaplan, G.G. (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46-54 e42; quiz e30.

Montreewasuwat, N., and Olson, J.A. (1979). Serum and liver concentrations of vitamin A in Thai fetuses as a function of gestational age. *The American journal of clinical nutrition* 32, 601-606.

Moore, T., and Holmes, P.D. (1971). The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Lab Anim* 5, 239-250.

Mora, J.R. (2008). Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflammatory bowel diseases* 14, 275-289.

Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., *et al.* (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science (New York, N.Y)* 314, 1157-1160.

Morrow, A.L., and Rangel, J.M. (2004). Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Seminars in pediatric infectious diseases* 15, 221-228.

Mosconi, E., Rekima, A., Seitz-Polski, B., Kanda, A., Fleury, S., Tissandie, E., Monteiro, R., Dombrowicz, D.D., Julia, V., Glaichenhaus, N., and Verhasselt, V. (2010). Breast milk immune complexes are potent

inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal immunology* 3, 461-474.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7, 145-173.

Mosmann, T.R., and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* 17, 138-146.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews. Immunology* 3, 331-341.

Mowat, A.M., Steel, M., Leishman, A.J., and Garside, P. (1999). Normal induction of oral tolerance in the absence of a functional IL-12-dependent IFN-gamma signaling pathway. *J Immunol* 163, 4728-4736.

Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *The Journal of clinical investigation* 115, 1923-1933.

Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science (New York, N.Y)* 317, 256-260.

Muncan, V., Heijmans, J., Krasinski, S.D., Buller, N.V., Wildenberg, M.E., Meisner, S., Radonjic, M., Stapleton, K.A., Lamers, W.H., Biemond, I., *et al.* (2011). Blimp1 regulates the transition of neonatal to adult intestinal epithelium. *Nat Commun* 2, 452.

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature immunology* 10, 1178-1184.

Muraro, A., Halken, S., Arshad, S.H., Beyer, K., Dubois, A.E., Du Toit, G., Eigenmann, P.A., Grimshaw, K.E., Hoest, A., Lack, G., *et al.* (2014). EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines. Primary prevention of food allergy. *Allergy* 69, 590-601.

Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 198, 1951-1957.

Muthukkumar, S., Goldstein, J., and Stein, K.E. (2000). The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. *J Immunol* 165, 4803-4813.

Nagatani, K., Sagawa, K., Komagata, Y., and Yamamoto, K. (2004). Peyer's patch dendritic cells capturing oral antigen interact with antigen-specific T cells and induce gut-homing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Peyer's patches. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1029, 366-370.

Nagler-Anderson, C., Bober, L.A., Robinson, M.E., Siskind, G.W., and Thorbecke, G.J. (1986). Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 7443-7446.

Nagler, A., Ohana, M., Alper, R., Doviner, V., Sherman, Y., Rabbani, E., Engelhardt, D., and Ilan, Y. (2003). Induction of oral tolerance in bone marrow transplantation recipients suppresses graft-versus-host disease in a semiallogeneic mouse model. *Bone marrow transplantation* 32, 363-369.

Nagler, A., Pines, M., Abadi, U., Pappo, O., Zeira, M., Rabbani, E., Engelhardt, D., Ohana, M., Chowdhury, N.R., Chowdhury, J.R., and Ilan, Y. (2000). Oral tolerization ameliorates liver disorders associated with chronic graft versus host disease in mice. *Hepatology* 31, 641-648.

Nakagome, K., Okunishi, K., Imamura, M., Harada, H., Matsumoto, T., Tanaka, R., Miyazaki, J., Yamamoto, K., and Dohi, M. (2009). IFN-gamma attenuates antigen-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune regulatory cytokine. *J Immunol* 183, 209-220.

Nakajima, H., Takamori, H., Hiyama, Y., and Tsukada, W. (1990). The effect of treatment with interferon-gamma on type II collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 81, 441-445.

Neu, J. (2007). Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *The American journal of clinical nutrition* 85, 629S-634S.

Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Presky, D.H., Waegell, W., and Strober, W. (1996). Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *The Journal of experimental medicine* 183, 2605-2616.

Newburg, D.S. (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Current medicinal chemistry* 6, 117-127.

Newburg, D.S., Peterson, J.A., Ruiz-Palacios, G.M., Matson, D.O., Morrow, A.L., Shults, J., Guerrero, M.L., Chaturvedi, P., Newburg, S.O., Scallan, C.D., *et al.* (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351, 1160-1164.

Nichols, B.L., McKee, K.S., Henry, J.F., and Putman, M. (1987). Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatric research* 21, 563-567.

Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., *et al.* (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science (New York, N.Y)* 307, 254-258.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology* 8, 34-47.

Noback, C.R., and Takahashi, Y.I. (1978). Micromorphology of the placenta of rats reared on marginal vitamin-A-deficient diet. *Acta anatomica* 102, 195-202.

Noverr, M.C., and Huffnagle, G.B. (2005). The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35, 1511-1520.

Nudel, I., Elnekave, M., Furmanov, K., Arizon, M., Clausen, B.E., Wilensky, A., and Hovav, A.H. (2011). Dendritic cells in distinct oral mucosal tissues engage different mechanisms to prime CD8+ T cells. *J Immunol* 186, 891-900.

Nurmatov, U., Devereux, G., and Sheikh, A. (2011). Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127, 724-733 e721-730.

O'Byrne, S.M., Wongsiriroj, N., Libien, J., Vogel, S., Goldberg, I.J., Baehr, W., Palczewski, K., and Blaner, W.S. (2005). Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *The Journal of biological chemistry* 280, 35647-35657.

Oddy, W.H., and Rosales, F. (2010). A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr Allergy Immunol* 21, 47-59.

Odle, J. (1997). New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model. *The Journal of nutrition* 127, 1061-1067.

Olson, J.A. (1979). Liver vitamin A reserves of neonates, preschool children and adults dying of various causes in Salvador, Brazil. *Archivos latinoamericanos de nutricion* 29, 521-545.

Olson, J.A. (1987). Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *The American journal of clinical nutrition* 45, 704-716.

Olson, J.A., Gunning, D.B., and Tilton, R.A. (1984). Liver concentrations of vitamin A and carotenoids, as a function of age and other parameters, of American children who died of various causes. *The American journal of clinical nutrition* 39, 903-910.

Ong, D.E. (1994). Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutrition reviews* 52, S24-31.

Owen, R.D. (1945). Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses between Bovine Twins. *Science (New York, N.Y)* 102, 400-401.

Pabst, O., and Mowat, A.M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology* 5, 232-239.

Paidassi, H., Acharya, M., Zhang, A., Mukhopadhyay, S., Kwon, M., Chow, C., Stuart, L.M., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2011). Preferential expression of integrin alphavbeta8 promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. *Gastroenterology* 141, 1813-1820.

Palmer, D.J., and Makrides, M. (2006). Diet of lactating women and allergic reactions in their infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9, 284-288.

Palou, A., and Pico, C. (2009). Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite* 52, 249-252.

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., and von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochimica et biophysica acta* 1426, 439-448.

Penders, J., Thijs, C., van den Brandt, P.A., Kummeling, I., Snijders, B., Stelma, F., Adams, H., van Ree, R., and Stobberingh, E.E. (2007). Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 56, 661-667.

Penttila, I. (2006). Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatric research* 59, 650-655.

Penttila, I.A., Flesch, I.E., McCue, A.L., Powell, B.C., Zhou, F.H., Read, L.C., and Zola, H. (2003). Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups. *Gut* 52, 1579-1586.

Penttila, I.A., van Spriel, A.B., Zhang, M.F., Xian, C.J., Steeb, C.B., Cummins, A.G., Zola, H., and Read, L.C. (1998). Transforming growth factor-beta levels in maternal milk and expression in postnatal rat duodenum and ileum. *Pediatric research* 44, 524-531.

Pesonen, M., Kallio, M.J., Siimes, M.A., and Ranki, A. (2007). Retinol concentrations after birth are inversely associated with atopic manifestations in children and young adults. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37, 54-61.

Pfahl, M., and Chytil, F. (1996). Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Annual review of nutrition* 16, 257-283.

Pico, C., Sanchez, J., Oliver, P., Miralles, O., Ceresi, E., and Palou, A. (2007). Role of leptin present in maternal milk in the control of energy balance during the post-natal period. *Genes & nutrition* 2, 139-141.

Pierre, M., Husson, M.O., Le Berre, R., Desseyn, J.L., Galabert, C., Beghin, L., Beermann, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Cardinaud, B., *et al.* (2007). Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292, L1422-1431.

Plaut, A.G., Qiu, J., and St Geme, J.W., 3rd (2000). Human lactoferrin proteolytic activity: analysis of the cleaved region in the IgA protease of *Haemophilus influenzae*. *Vaccine* 19 Suppl 1, S148-152.

Polanski, M., Melican, N.S., Zhang, J., and Weiner, H.L. (1997). Oral administration of the immunodominant B-chain of insulin reduces diabetes in a co-transfer model of diabetes in the NOD mouse and is associated with a switch from Th1 to Th2 cytokines. *Journal of autoimmunity* 10, 339-346.

Polosa, R., Knoke, J.D., Russo, C., Piccillo, G., Caponnetto, P., Sarva, M., Proietti, L., and Al-Delaimy, W.K. (2008). Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121, 1428-1434.

Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., and Coffman, R.L. (1994a). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *The Journal of experimental medicine* 179, 589-600.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1994b). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. *Immunity* 1, 553-562.

Prescott, S.L., Macaubas, C., Holt, B.J., Smallacombe, T.B., Loh, R., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1998). Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 160, 4730-4737.

Prescott, S.L., Macaubas, C., Smallacombe, T., Holt, B.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. (1999). Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353, 196-200.

Prioult, G., Fliss, I., and Pecquet, S. (2003). Effect of probiotic bacteria on induction and maintenance of oral tolerance to beta-lactoglobulin in gnotobiotic mice. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10, 787-792.

Qiao, S.W., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2007). How the controller is controlled - neonatal Fc receptor expression and immunoglobulin G homeostasis. *Immunology* 120, 145-147.

Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V., and Gottesman, M.E. (1999). Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *The EMBO journal* 18, 4633-4644.

Quadro, L., Hamberger, L., Gottesman, M.E., Colantuoni, V., Ramakrishnan, R., and Blaner, W.S. (2004). Transplacental delivery of retinoid: the role of retinol-binding protein and lipoprotein retinyl ester. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 286, E844-851.

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine* 183, 1161-1172.

Rautava, S., Kalliomaki, M., and Isolauri, E. (2002). Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109, 119-121.

Reber, P.M. (1993). Prolactin and immunomodulation. *The American journal of medicine* 95, 637-644.

Rice, A.L., Stoltzfus, R.J., de Francisco, A., Chakraborty, J., Kjolhede, C.L., and Wahed, M.A. (1999). Maternal vitamin A or beta-carotene supplementation in lactating bangladeshi women benefits mothers and infants but does not prevent subclinical deficiency. *The Journal of nutrition* 129, 356-365.

Ridge, J.P., Fuchs, E.J., and Matzinger, P. (1996). Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science (New York, N.Y)* 271, 1723-1726.

Rivas, R.A., el-Mohandes, A.A., and Katona, I.M. (1994). Mononuclear phagocytic cells in human milk: HLA-DR and Fc gamma R ligand expression. *Biology of the neonate* 66, 195-204.

Rizzo, L.V., Morawetz, R.A., Miller-Rivero, N.E., Choi, R., Wiggert, B., Chan, C.C., Morse, H.C., 3rd, Nussenblatt, R.B., and Caspi, R.R. (1999). IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J Immunol* 162, 2613-2622.

Roponen, M., Hyvarinen, A., Hirvonen, M.R., Keski-Nisula, L., and Pekkanen, J. (2005). Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116, 1048-1052.

Rose, S., Lichtenheld, M., Foote, M.R., and Adkins, B. (2007). Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. *J Immunol* 178, 2667-2678.

Ross, A.C. (1992). Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 200, 303-320.

Ross, A.C. (2010). Diet in vitamin A research. *Methods Mol Biol* 652, 295-313.

Rothman, K.J., Moore, L.L., Singer, M.R., Nguyen, U.S., Mannino, S., and Milunsky, A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake. *The New England journal of medicine* 333, 1369-1373.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9, 313-323.

Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2010). Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 12204-12209.

Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., and Rudensky, A.Y. (2010). Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science (New York, N.Y)* 329, 1667-1671.

Ruhl, R., Hanel, A., Garcia, A.L., Dahten, A., Herz, U., Schweigert, F.J., and Worm, M. (2007). Role of vitamin A elimination or supplementation diets during postnatal development on the allergic sensitisation in mice. *Mol Nutr Food Res* 51, 1173-1181.

Russell, D.H., Mills, K.T., Talamantes, F.J., and Bern, H.A. (1988). Neonatal administration of prolactin antiserum alters the developmental pattern of T- and B-lymphocytes in the thymus and spleen of BALB/c female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7404-7407.

Ryan, M., Gothefors, L., Storsaeter, J., and Mills, K.H. (1997a). Bordetella pertussis-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison

of the T cell cytokine profiles in infants and mice. *Developments in biological standardization* 89, 297-305.

Ryan, M., Murphy, G., Gothefors, L., Nilsson, L., Storsaeter, J., and Mills, K.H. (1997b). Bordetella pertussis respiratory infection in children is associated with preferential activation of type 1 T helper cells. *The Journal of infectious diseases* 175, 1246-1250.

Sakaguchi, S. (2000). Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Current opinion in immunology* 12, 684-690.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

Sarzotti, M., Robbins, D.S., and Hoffman, P.M. (1996). Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science (New York, N.Y)* 271, 1726-1728.

Scholtens, S., Wijga, A.H., Brunekreef, B., Kerkhof, M., Hoekstra, M.O., Gerritsen, J., Aalberse, R., de Jongste, J.C., and Smit, H.A. (2009). Breast feeding, parental allergy and asthma in children followed for 8 years. The PIAMA birth cohort study. *Thorax* 64, 604-609.

Schroten, H., Stapper, C., Plogmann, R., Kohler, H., Hacker, J., and Hanisch, F.G. (1998). Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S-fimbriated Escherichia coli are mediated by sialyloligosaccharides. *Infection and immunity* 66, 3971-3973.

Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of experimental medicine* 206, 3101-3114.

Schuster, G.U., Kenyon, N.J., and Stephensen, C.B. (2008). Vitamin A deficiency decreases and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma. *J Immunol* 180, 1834-1842.

Sears, M.R., Greene, J.M., Willan, A.R., Taylor, D.R., Flannery, E.M., Cowan, J.O., Herbison, G.P., and Poulton, R. (2002). Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* 360, 901-907.

Seder, R.A., Paul, W.E., Davis, M.M., and Fazekas de St Groth, B. (1992). The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *The Journal of experimental medicine* 176, 1091-1098.

Semba, R.D. (1998). The role of vitamin A and related retinoids in immune function. *Nutrition reviews* 56, S38-48.

Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., and Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (New York, N.Y)* 297, 2275-2279.

Shenai, J.P., Chytil, F., Jhaveri, A., and Stahlman, M.T. (1981). Plasma vitamin A and retinol-binding protein in premature and term neonates. *The Journal of pediatrics* 99, 302-305.

Shevach, E.M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195-201.

Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636-645.

Sicherer, S.H. (2002). Food allergy. *Lancet* 360, 701-710.

Siegle, J.S., Hansbro, N., Dong, C., Angkasekwinai, P., Foster, P.S., and Kumar, R.K. (2011). Blocking induction of T helper type 2 responses prevents development of disease in a model of childhood asthma. *Clinical and experimental immunology* 165, 19-28.

Silfverdal, S.A., Bodin, L., Hugosson, S., Garpenholt, O., Werner, B., Esbjorner, E., Lindquist, B., and Olcen, P. (1997). Protective effect of breastfeeding on invasive Haemophilus influenzae infection: a case-control study in Swedish preschool children. *International journal of epidemiology* 26, 443-450.

Singh, B., Read, S., Asseman, C., Malmstrom, V., Mottet, C., Stephens, L.A., Stepankova, R., Tlaskalova, H., and Powrie, F. (2001). Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunological reviews* 182, 190-200.

Sjogren, Y.M., Jenmalm, M.C., Bottcher, M.F., Bjorksten, B., and Sverremark-Ekstrom, E. (2009). Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39, 518-526.

Slavin, A.J., Maron, R., and Weiner, H.L. (2001). Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *International immunology* 13, 825-833.

Sommer, A. (1998). Xerophthalmia and vitamin A status. *Progress in retinal and eye research* 17, 9-31.

Sommer, A. (2008). Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview. *The Journal of nutrition* 138, 1835-1839.

Sommer, A. (2014). Preventing blindness and saving lives: the centenary of vitamin A. *JAMA ophthalmology* 132, 115-117.

Spahn, T.W., Fontana, A., Faria, A.M., Slavin, A.J., Eugster, H.P., Zhang, X., Koni, P.A., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., Rennert, P.D., and Weiner, H.L. (2001). Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *European journal of immunology* 31, 1278-1287.

Spahn, T.W., Weiner, H.L., Rennert, P.D., Lugering, N., Fontana, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *European journal of immunology* 32, 1109-1113.

Spencer, S.P., Wilhelm, C., Yang, Q., Hall, J.A., Bouladoux, N., Boyd, A., Nutman, T.B., Urban, J.F., Jr., Wang, J., Ramalingam, T.R., *et al.* (2014). Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science (New York, N.Y)* 343, 432-437.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., *et al.* (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology* 13, 145-149.

Steele, W.F., and Morrison, M. (1969). Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. *Journal of bacteriology* 97, 635-639.

Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W., and Remaut, E. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science (New York, N.Y)* 289, 1352-1355.

Stephensen, C.B. (2001). Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr* 21, 167-192.

Stern, D.A., Guerra, S., Halonen, M., Wright, A.L., and Martinez, F.D. (2007). Low IFN-gamma production in the first year of life as a predictor of wheeze during childhood. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120, 835-841.

Stoll, B.J., Hansen, N.I., Sanchez, P.J., Faix, R.G., Poindexter, B.B., Van Meurs, K.P., Bizzarro, M.J., Goldberg, R.N., Frantz, I.D., 3rd, Hale, E.C., *et al.* (2011). Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics* 127, 817-826.

Stoltzfus, R.J., Hakimi, M., Miller, K.W., Rasmussen, K.M., Dawiesah, S., Habicht, J.P., and Dibley, M.J. (1993). High dose vitamin A supplementation of breast-feeding Indonesian mothers: effects on the vitamin A status of mother and infant. *The Journal of nutrition* 123, 666-675.

Strobel, S. (1996). Neonatal oral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 778, 88-102.

Strobel, S. (2001). Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation. *The Proceedings of the Nutrition Society* 60, 437-442.

Strobel, S., and Ferguson, A. (1984). Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatric research* 18, 588-594.

Stromqvist, M., Falk, P., Bergstrom, S., Hansson, L., Lonnerdal, B., Normark, S., and Hernell, O. (1995). Human milk kappa-casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 21, 288-296.

Sun, C.M., Deriaud, E., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2005). Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 22, 467-477.

Sun, C.M., Fiette, L., Tanguy, M., Leclerc, C., and Lo-Man, R. (2003). Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood* 102, 585-591.

Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* 204, 1775-1785.

Sun, J.B., Raghavan, S., Sjoling, A., Lundin, S., and Holmgren, J. (2006). Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both Foxp3+CD25+ and Foxp3-CD25- CD4+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 7634-7644.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

Takemoto, N., Koyano-Nakagawa, N., Yokota, T., Arai, N., Miyatake, S., and Arai, K. (1998). Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *International immunology* 10, 1981-1985.

Tang, M.L., Kemp, A.S., Thorburn, J., and Hill, D.J. (1994). Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 344, 983-985.

Thompson, H.S., and Staines, N.A. (1986). Gastric administration of type II collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. *Clinical and experimental immunology* 64, 581-586.

Thorne-Lyman, A., and Fawzi, W.W. (2011). Improving child survival through vitamin A supplementation. *Bmj* 343, d5294.

Tiittanen, M., Paronen, J., Savilahti, E., Virtanen, S.M., Ilonen, J., Knip, M., Akerblom, H.K., and Vaarala, O. (2006). Dietary insulin as an immunogen and tolerogen. *Pediatr Allergy Immunol* 17, 538-543.

Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., and Kawase, K. (1991). Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of dairy science* 74, 4137-4142.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology* 9, 194-202.

Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., *et al.* (2007). Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449, 361-365.

Tsicopoulos, A., Hamid, Q., Varney, V., Ying, S., Moqbel, R., Durham, S.R., and Kay, A.B. (1992). Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* 148, 2058-2061.

Tsuji, N.M., Mizumachi, K., and Kurisaki, J. (2001). Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103, 458-464.

Tulic, M.K., Andrews, D., Crook, M.L., Charles, A., Tourigny, M.R., Moqbel, R., and Prescott, S.L. (2012). Changes in thymic regulatory T-cell maturation from birth to puberty: Differences in atopic children. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129, 199-206 e194.

Tulic, M.K., Hodder, M., Forsberg, A., McCarthy, S., Richman, T., D'Vaz, N., van den Biggelaar, A.H., Thornton, C.A., and Prescott, S.L. (2011). Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127, 470-478 e471.

Udall, J.N., Colony, P., Fritze, L., Pang, K., Trier, J.S., and Walker, W.A. (1981a). Development of gastrointestinal mucosal barrier. II. The effect of natural versus artificial feeding on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatric research* 15, 245-249.

Udall, J.N., Pang, K., Fritze, L., Kleinman, R., and Walker, W.A. (1981b). Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatric research* 15, 241-244.

Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., and Roy, N.C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of nutrition* 141, 769-776.

Vahlquist, A., Rask, L., Peterson, P.A., and Berg, T. (1975). The concentrations of retinol-binding protein, prealbumin, and transferrin in the sera of newly delivered mothers and children of various ages. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 35, 569-575.

van Bennekum, A.M., Kako, Y., Weinstock, P.H., Harrison, E.H., Deckelbaum, R.J., Goldberg, I.J., and Blaner, W.S. (1999). Lipoprotein lipase expression level influences tissue clearance of chylomicron retinyl ester. *Journal of lipid research* 40, 565-574.

van de Pavert, S.A., Ferreira, M., Domingues, R.G., Ribeiro, H., Molenaar, R., Moreira-Santos, L., Almeida, F.F., Ibiza, S., Barbosa, I., Goverse, G., *et al.* (2014). Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature* 508, 123-127.

Van de Perre, P. (2003). Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* 21, 3374-3376.

Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J.K., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* 52, 1690-1697.

van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337-349.

van Odijk, J., Kull, I., Borres, M.P., Brandtzaeg, P., Edberg, U., Hanson, L.A., Host, A., Kuitunen, M., Olsen, S.F., Skerfving, S., *et al.* (2003). Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* 58, 833-843.

van Pelt, A.M., and de Rooij, D.G. (1990). Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biology of reproduction* 43, 363-367.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.

Velilla, P.A., Rugeles, M.T., and Chougnet, C.A. (2006). Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 121, 251-259.

Verhasselt, V. (2010a). Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Current opinion in immunology* 22, 623-630.

Verhasselt, V. (2010b). Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal immunology* 3, 326-333.

Verhasselt, V., Milcent, V., Cazareth, J., Kanda, A., Fleury, S., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N., and Julia, V. (2008). Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nature medicine* 14, 170-175.

Vidal, K., van den Broek, P., Lorget, F., and Donnet-Hughes, A. (2004). Osteoprotegerin in human milk: a potential role in the regulation of bone metabolism and immune development. *Pediatric research* 55, 1001-1008.

Vieira, P.L., Christensen, J.R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172, 5986-5993.

Villablanca, E.J., Wang, S., de Calisto, J., Gomes, D.C., Kane, M.A., Napoli, J.L., Blaner, W.S., Kagechika, H., Blomhoff, R., Roseblatt, M., *et al.* (2011). MyD88 and retinoic acid signaling pathways interact to modulate gastrointestinal activities of dendritic cells. *Gastroenterology* 141, 176-185.

Viney, J.L., Mowat, A.M., O'Malley, J.M., Williamson, E., and Fanger, N.A. (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* 160, 5815-5825.

Vogel, S., Piantadosi, R., O'Byrne, S.M., Kako, Y., Quadro, L., Gottesman, M.E., Goldberg, I.J., and Blaner, W.S. (2002). Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry* 41, 15360-15368.

von Herrath, M.G., Dyrberg, T., and Oldstone, M.B. (1996). Oral insulin treatment suppresses virus-induced antigen-specific destruction of beta cells and prevents autoimmune diabetes in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 98, 1324-1331.

von Mutius, E. (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology* 212, 433-439.

Vuillermine, P.J., Ponsonby, A.L., Saffery, R., Tang, M.L., Ellis, J.A., Sly, P., and Holt, P. (2009). Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. *Allergy* 64, 348-353.

Wahn, U., and von Mutius, E. (2001). Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *J Allergy Clin Immunol* 107, 567-574.

Wald, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219, 800-807.

Walton, K.L., Galanko, J.A., Balfour Sartor, R., and Fisher, N.C. (2006). T cell-mediated oral tolerance is intact in germ-free mice. *Clinical and experimental immunology* 143, 503-512.

Wang, G., Miyahara, Y., Guo, Z., Khattar, M., Stepkowski, S.M., and Chen, W. (2010). "Default" generation of neonatal regulatory T cells. *J Immunol* 185, 71-78.

Wang, S., Villablanca, E.J., De Calisto, J., Gomes, D.C., Nguyen, D.D., Mizoguchi, E., Kagan, J.C., Reinecker, H.C., Hacohen, N., Nagler, C., *et al.* (2011). MyD88-dependent TLR1/2 signals educate dendritic cells with gut-specific imprinting properties. *J Immunol* 187, 141-150.

Warshaw, A.L., Walker, W.A., Cornell, R., and Isselbacher, K.J. (1971). Small intestinal permeability to macromolecules. Transmission of horseradish peroxidase into mesenteric lymph and portal blood. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 25, 675-684.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology* 25, 821-852.

Weaver, L.T., Laker, M.F., and Nelson, R. (1984). Intestinal permeability in the newborn. *Archives of disease in childhood* 59, 236-241.

Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., and Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today* 14, 353-356.

Weiner, H.L. (2001a). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological reviews* 182, 207-214.

Weiner, H.L. (2001b). The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nature immunology* 2, 671-672.

Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., and Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunological reviews* 241, 241-259.

Wellik, D.M., and DeLuca, H.F. (1995). Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A-deficient rats. *Biology of reproduction* 53, 1392-1397.

West, K.P., Jr. (2002). Extent of vitamin A deficiency among preschool children and women of reproductive age. *The Journal of nutrition* 132, 2857S-2866S.

Whitacre, C.C., Gienapp, I.E., Orosz, C.G., and Bitar, D.M. (1991). Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 147, 2155-2163.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* 27, 18-20.

Willems, F., Vollstedt, S., and Suter, M. (2009). Phenotype and function of neonatal DC. *European journal of immunology* 39, 26-35.

Wilson, A.C., Forsyth, J.S., Greene, S.A., Irvine, L., Hau, C., and Howie, P.W. (1998). Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. *Bmj* 316, 21-25.

Wilson, J.G., Roth, C.B., and Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *The American journal of anatomy* 92, 189-217.

Wolbach, S.B., and Howe, P.R. (1925). Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin. *The Journal of experimental medicine* 42, 753-777.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 519-527.

Wu, J., Zhang, Y., Liu, Q., Zhong, W., and Xia, Z. (2013). All-trans retinoic acid attenuates airway inflammation by inhibiting Th2 and Th17 response in experimental allergic asthma. *BMC immunology* 14, 28.

Wu, L., and Liu, Y.J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26, 741-750.

Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R.J., Weinberg, K., Rea, T.H., Bloom, B.R., and Modlin, R.L. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science (New York, N.Y)* 254, 277-279.

Yang, P.C., Berin, M.C., Yu, L.C., Conrad, D.H., and Perdue, M.H. (2000). Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FcεpsilonRII). *The Journal of clinical investigation* 106, 879-886.

Yokota, A., Takeuchi, H., Maeda, N., Ohoka, Y., Kato, C., Song, S.Y., and Iwata, M. (2009). GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *International immunology* 21, 361-377.

Yoshida, M., Claypool, S.M., Wagner, J.S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20, 769-783.

Yoshino, S. (1995). Antigen-induced arthritis in rats is suppressed by the inducing antigen administered orally before, but not after immunization. *Cellular immunology* 163, 55-58.

Yoshino, S. (1998). Effect of a monoclonal antibody against interleukin-4 on collagen-induced arthritis in mice. *British journal of pharmacology* 123, 237-242.

Yoshino, S., Quattrocchi, E., and Weiner, H.L. (1995). Suppression of antigen-induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. *Arthritis and rheumatism* 38, 1092-1096.

Yoshino, S., and Yoshino, J. (1998). Effect of a monoclonal antibody against interleukin-4 on suppression of antigen-induced arthritis in mice by oral administration of the inducing antigen. *Cellular immunology* 187, 139-144.

You, D., Becnel, D., Wang, K., Ripple, M., Daly, M., and Cormier, S.A. (2006). Exposure of neonates to respiratory syncytial virus is critical in determining subsequent airway response in adults. *Respiratory research* 7, 107.

Zaghouani, H., Hoeman, C.M., and Adkins, B. (2009). Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends in immunology* 30, 585-591.

Zhang, X., Izikson, L., Liu, L., and Weiner, H.L. (2001). Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* 167, 4245-4253.

Zhang, Z.J., Davidson, L., Eisenbarth, G., and Weiner, H.L. (1991). Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10252-10256.

Zhang, Z.Y., Lee, C.S., Lider, O., and Weiner, H.L. (1990). Suppression of adjuvant arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. *J Immunol* 145, 2489-2493.

Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., and Horwitz, D.A. (2007a). IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178, 2018-2027.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.

Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007b). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936-940.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine* 4, 594-600.